MIKROKALORIMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR PROTEINSYNTHESE IN ZELLFREIEN SYSTEMEN AUS HEFE

Inaugural-Dissertation
vorgelegt beim
Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik
der Freien Universität Berlin
zur Erlangung der Würde eines
Doctor Rerum Naturalium

von
Luise Berthe - Corti
aus Rielasingen

1975

MIKROKALORIMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR PROTEINSYNTHESE IN ZELLFREIEN SYSTEMEN AUS HEFE

Inaugural-Dissertation
vorgelegt beim
Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik
der Freien Universität Berlin
zur Erlangung der Würde eines
Doctor Rerum Naturalium

von
Luise Berthe - Corti
aus Rielasingen

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Priv.-Doz. Dr. I. Lamprecht
2. Referent: Prof. Dr. E.-R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 3. April 1975
Tag der Promotion:

Druck: Zentrale Universitätsdruckerei, V a A 4

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

2. Problemstellung 5

3. Methoden und Material 7

3.1. Methoden 7

3.1.1. Aufzuchtbedingungen und Vorbereitung der Zellen 7

3.1.2. Isolierung der Zellfraktionen und Versuche zur Peptidsynthese mit ^{14}C-Phenylalanin 7

3.1.3. Bestimmung der Konzentration an ribosomalem Protein 8

3.1.4. Probleme der mikrokalorimetrischen Messungen 8

3.2. Material 11

4. Optimierung des biochemischen Systems 12

4.1. Isolierung und Reinigung der zellfreien Komponenten für die ^{14}C-Phenylalaninsynthese 12

4.1.1. Änderung des pH-Wertes des Isolierungspuffers 14

4.1.2. Änderung der Isolierungs- und Reinigungsmethode für Ribosomen 15

4.1.3. Reinigung der Enzymfraktion 18

4.2. Aktivitätsbestimmung der isolierten Fraktionen 19

4.2.1. Komponentenabhängigkeit 19

4.2.2. Abhängigkeit des Einbaus von der Menge an zugeführten Triphosphaten (MIX) 22

5. Untersuchungen zur Verwertbarkeit des biochemischen Systems für das Mikrokalorimeter 24

5.1. Methodische Unterschiede 24

5.1.1. Bestimmung der optimalen Versuchstemperatur im Mikrokalorimeter 25

5.1.2. Bestimmung des Aktivitätsverlusts der Fraktionen durch Vortemperieren 25

5.1.3. Nachweis der Peptidsynthese im Mikrokalorimeter mit Hilfe von ^{14}C-Phenylalanin 27

5.1.4. Test der verwendeten Fraktionen auf ihr Verhalten im Mikrokalorimeter 27

5.2. Komponentenabhängigkeit 29

5.2.1. Abhängigkeit von der Enzymfraktion (System I) 29

5.2.2. Abhängigkeit vom MIX 31

5.2.3. Abhängigkeit der insgesamt abgegebenen Wärmemenge von der Menge an Ribosomen (System II,III) 32

5.3. Vergleich der Systeme I bis IV 32

5.3.1. Thermogramme von Vollsystemen 33

5.3.2. Abhängigkeit des Thermogrammverlaufs von der Enzymfraktion 33

5.3.3. RNS- und Phosphat spaltende Enzyme am Ribosom 35

5.3.4. Thermogrammverlauf der Aminoacylierung 36

5.3.5. Abhängigkeit des Thermogrammverlaufs von der Menge und dem Reinigungsgrad der Ribosomen 38

6. Inhibition der Proteinbiosynthese 42

6.1. Methode der Inhibition 43

6.1.1. - im biochemischen Ansatz, d.h. Synthese von ^{14}C-Polyphenylalanin 43

6.1.2. - im mikrokalorimetrischen Ansatz 43

6.2. Wirkungsort und -mechanismen der Inhibition 43

6.2.1. Cycloheximid 45

6.2.2. Puromycin 45

6.2.3. Chloramphenicol 47

6.2.4. Ribonuclease (RNase) 47

6.3. Versuche der Interpretation der erhaltenen Thermogramme 47

6.3.1. RNase 48

6.3.2. Puromycin 48

6.3.3. Cycloheximid 48

6.3.4. Chloramphenicol 48

7. Enzymreaktionen am Ribosom 51

7.1. Exotherm verlaufende Reaktionen am Ribosom 51

7.2. Ribonucleasen (RNasen)-Aktivität am Ribosom 53

7.2.1. Photometrische Bestimmung der RNasen-Aktivität 56

7.2.2. Nachweis der RNasen-Aktivität von Ribosomenfraktionen im Mikrokalorimeter 59

7.2.3. Vergleichende Untersuchungen zur RNasen-Aktivität mit käuflichen Substanzen 62

7.2.4. Interpretation der erhaltenen Thermogramme 63

7.3. Adenosintriphosphatase (ATPase)- und Guanosintriphosphatase (GTPase)- Aktivität am Ribosom 64

7.3.1. Nachweis der ATPase-Aktivität an Heferibosomen 65

7.3.2. Biochemische Bestimmung der ATPasen-Aktivität 67

7.3.3. Bestimmung der Wärmetönung der ATPase-Aktivität 69

7.3.4. Versuch der Einordnung der erhaltenen Thermogramme 75

7.3.5. Nachweis von GTPase-Aktivität im Mikrokalorimeter 76

8. Zusammenfassung und Diskussion 78

8.1. Zusammenfassung 78

8.2. Diskussion 80

8.2.1. Ist es grundsätzlich möglich die mit der PBS verbundene Wärmetönung im Mikrokalorimeter zu erfassen 81

8.2.2. Welche Prozesse spielen beim Nachweis von PBS im Mikrokalorimeter eine besondere Rolle 82

8.2.3. Sind die von Uttech erhaltenen Thermogramme auf PBS zurückzuführen 88

8.3. Kurzer Ausblick

Anhang I 90

Anhang II 97

9. Literaturverzeichnis 103

1. Einleitung

Wenn man von Proteinsynthese (PBS) spricht, so meint man den Vorgang der Umsetzung der genetischen Information in der Zelle, der von Crick 1958 erstmals formuliert wurde (1):
DNS macht RNS, RNS macht Protein*.

Dieser Prozess wurde "zentrales Dogma" genannt, denn er nimmt eine zentrale Stellung in der Übertragung der im genetischen Material fixierten Information zu den einzelnen Stellen im Plasma der Zelle ein. Seine Bedeutung stieg in dem Maße, in dem die Veränderung der genetischen Merkmale als Ursache von Stoffwechselanomalien erkannt wurde. Als Folge defekter Strukturen von DNS und RNS werden wichtige Enzyme nicht oder falsch synthetisiert. Das Entstehen solcher Defekte wird u.a. begünstigt durch Umweltfaktoren** sowie durch die Anwendung von Antibiotika in der modernen Medizin*** (2,3).

Schon vor der Formulierung des "zentralen Dogmas der Genetik" hatten Zamecnik und Keller eine Arbeit über ein zellfreies PBS-System veröffentlicht (4). Seither wurde durch zahlreiche Arbeiten über zellfreie Systeme von Mikroorganismen - zuerst hauptsächlich mit E. coli später mit zahlreichen Eukaryonten - der PBS-Mechanismus aufgeschlüsselt. Das zellfreie PBS-System erwies sich dafür als sehr geeignet. Vor allem zwei Arten haben sich herauskristallisiert .

---

* DNS = Desoxyribonucleinsäure, RNS = Ribonucleinsäure

** Defekte werden durch steigende Konzentration an mutagenen und cancerogenen Agenzien in Wasser und Nahrung begünstigt, wie z.B. Nitrite und Nitrate, die als Konservierungsmittel von Wurst und Fleisch sowie als Düngemittel verwendet werden.

*** Es sind mehr als ein Dutzend Antibiotika bekannt, die in der Therapie Verwendung finden. Viele davon wirken sowohl auf Pro- als auch auf Eukaryonten, d.h. auf die Zellen des Patienten selbst.

Bei dem einen, dem von der DNS abhängigen System, wird die Synthese durch einen natürlichen Messenger codiert. Dieser Messenger wird an der DNS kopiert (5). Bei dem anderen, dem DNS unabhängigen System, werden die Peptide durch einen künstlichen Messenger codiert. Am haufigsten wurde Polyuridylsäure (Poly-U) verwendet (6,7,8).

Der größte Teil der Untersuchungen zur PBS wird in zellfreien Systemen, d.h. Systemen in vitro durchgeführt. Warum werden diese denen in vivo d.h. in der intakten Zelle vorgezogen?

Ein großer Vorteil des in vitro Systems gegenüber Studien in vivo besteht in der Möglichkeit, einzelne Reaktionen außerhalb der komplexen Zelle gezielt verfolgen zu können, d.h. man kann Teilreaktionen der PBS unter standardisierten Bedingungen - wie z.B. pH-Wert, Ionenkonzentration - genau untersuchen.
Als Nachteil des in vitro Systems erweist sich dabei, daß die Kompartimentierung der Zelle wegfällt und somit Reaktionen parallel ablaufen und sich gegenseitig beeinflussen, die in der intakten Zelle zeitlich oder räumlich getrennt sind. Das kann zu Störungen der Synthese führen. Man kann sie jedoch durch Reinigung der Zellfraktionen weitgehend ausschließen, so daß der Einsatz zellfreier Systeme für die Untersuchung der Proteinsynthese großen Nutzen bringt. Ein Zellrohextrakt enthält alle wasserlöslichen Bestandteile einer Zelle. Sie werden beim Aufschluß frei. Die zur PBS benötigten Fraktionen können daraus isoliert und gereinigt werden.

Proteinbiosynthese in Mikroorganismen oder Zellkulturen bestimmt man in der Regel durch Messung des Einbaus radioaktiv markierter Aminosäuren in das synthetisierte Protein. Hierbei bietet das zellfreie System den großen Vorteil, daß durch Fällen des gesuchten Proteins ein direkter Nachweis möglich ist. Die Impulsrate pro Minute ist dann ein Maß für die Menge an synthetisiertem

Protein. Gibt man alle für die PBS essentiellen Faktoren in einem Reagenzglas zusammen und bebrütet bei 20 bis 30 C, so findet auch hier PBS statt. Als essentielle Faktoren für die Knüpfung von Peptidbindungen findet man im Plasma lokalisierte Enzyme, Proteinfaktoren, messenger-, transfer-, ribosomale Ribonucleinsäure (m-,t-,r-RNS), Triphosphate (Adenosin-, Guanosintriphosphat), Aminosäuren (AS) und Ionen (Mg^{++}, K^{+}). Mit Hilfe solcher Systeme sind Untersuchungen über den biochemischen Ablauf der PBS in den letzten Jahren so weit gediehen, daß man über Syntheseschritte und ihre Regulation, sowie über dazu benötigte Faktoren detaillierte Kenntnisse hat (9,10,11).

Über den Energiehaushalt dieser Synthese gibt es bis jetzt nur recht pauschale Vorstellungen (6,12,13). Im Allgemeinen wird angenommen, daß zur Aminoacylierung d.h. zur Anlagerung der AS an die t-RNS ein ATP und zur Initiation und Elongation je 1 GTP verbraucht wird (14). Der Energieinhalt einer Peptidbindung beträgt zwischen $2 \cdot 10^3$ und $8 \cdot 10^3$ J/Mol je nach Länge der Peptidkette. Der Energieumsatz von 3 mal $3 \cdot 10^4$ J/Mol geknüpftes Peptid müßte genügen, um die Synthese in Gang zu halten. Diese Angaben sind jedoch nur grobe Abschätzungen. Nach neuen Ergebnissen von Blobel (15) sowie Horn und Erdmann (16) sind auch am Ribosom ATP spaltende Enzyme vorhanden. Es wäre also möglich, daß am Ribosom auch noch ATP hydrolysiert wird. Eine Einordnung der von Blobel und Horn gefundenen Ergebnisse in den Regulationsmechanismus der PBS ist jedoch nicht möglich.

Geht man davon aus, daß zwar feststeht, daß ATP und GTP zur PBS benötigt werden, über den genauen Energieumsatz bei ihrem Abbau jedoch nichts bekannt ist, so besteht durchaus das Bedürfnis, diesen Energieumsatz, der mit der PBS verbunden ist, zu untersuchen.

Die Mikrokalorimetrie ist eine Methode, die es erlaubt, parallel zu chemischen Reaktionen deren Wärmeumsatz zu bestimmen, ohne daß in die Reaktion eingegriffen werden muß. Es kann jedoch immer nur die Summe aller zu einem bestimmten Zeitpunkt ablaufenden Wärmeflüsse erfaßt werden. Daher ist es zur Interpretation der so erhaltenen Ergebnisse notwendig, chemische Daten über den untersuchten Prozess heranzuziehen.

2. Problemstellung

Als diese Arbeit begonnen wurde, lag in der Arbeitsgruppe die Dissertation von Uttech zur Erstellung eines zellfreien PBS-Systems aus Hefe vor (17). Für die mikrokalorimetrischen Untersuchungen standen zwei Publikationen von Uttech et al. (18) und Lamprecht et al. (19) zur Verfügung. Uttech hatte in ihrer Arbeit ein funktionsfähiges Poly-U abhängiges und ein DNS abhängiges System beschrieben. Das Poly-U abhängige System war von Uttech auch schon ansatzweise im Mikrokalorimeter getestet worden. Dabei hatte sie Thermogramme erhalten, die auf stark exotherme Prozesse hinwiesen (s. Abb.9 S.30). Diese waren nicht eindeutig reproduzierbar, zeigten jedoch immer einen exothermen, mehrgipfligen Verlauf.

Erste Anhaltspunkte dafür, daß diese Thermogramme auf PBS zurückzuführen waren, ergaben sich daraus, daß Uttech eine Korrelation zwischen der durch das PBS-System produzierten Wärme und den zugegebenen Fraktionen fand. Ebenfalls konnte errechnet werden, daß die dem System in Form von Triphosphaten zugeführte Energie (MIX IIa) wieder als Wärme abgegeben wurde.* Weiterhin zeigte sich, daß bei Weglassen der Ribosomenfraktion meist keine Wärmeabgabe mehr stattfand. Diese Ergebnisse berechtigen zu der Annahme, daß die produzierte Wärme jeweils auf PBS zurückzuführen war. Überprüft wurde diese Annahme jedoch nicht genau. Z.B. war die Wärmeproduktion eines Bakteriensystems, das im biochemischen Test 10-fach größere Peptidsynthese als ein Hefesystem zeigte, gleich groß. Der Thermogrammverlauf des Bakteriensystems zeigte sogar endotherme Prozesse.

---

* Dies wurde u.a. als Hinweis auf PBS gewertet, da wie in der Diskussion gezeigt wird, nur etwa 30% der aufgewendeten Energie in die Peptidbindung eingehen (s. Abschn.8).

Versuche zur Inhibition der PBS im Hefesystem mit Fussidinsäure bewirkten keine Veränderung der Thermogramme.

Meine Aufgabe bestand daher darin, mit dem vorhandenen zellfreien Hefesystem mikrokalorimetrische Untersuchungen durchzuführen mit dem Ziel, die die PBS begleitende Wärmetönung zu erfassen und wenn möglich nach den einzelnen Syntheseschritten aufzuschlüsseln. Insbesondere sollte auch untersucht werden, ob sich das vorliegende System zu mikrokalorimetrischen Untersuchungen eignet , oder ob die von Uttech erzielten Ergebnisse auf Prozesse zurückzuführen sind, die nicht direkt mit der PBS zusammenhängen.

Es erwies sich als notwendig, erst einmal das vorhandene biochemische System zu optimieren. Im Verlauf der mikrokalorimetrischen Experimente wurde es ebenfalls nötig, einige Enzymreaktionen, die die PBS begleiten, genauer zu bearbeiten.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die vorliegende Arbeit unter folgenden Aspekten angegangen wurde:
1) Ist es grundsätzlich möglich, PBS im Mikrokalorimeter nachzuweisen?
2) Welche Prozesse spielen dabei eine besondere Rolle?
3) Sind die von Uttech erhaltenen Thermogramme auf PBS zurückzuführen?
Diese Arbeit erfolgte in Zusammenhang mit der Arbeitsgruppe Molekularbiologie des Zentralinstitutes für Biochemie und Biophysik.

3. Methoden und Material

3.1. Methoden

3.1.1. Anzuchtbedingungen und Vorbereitung der Zellen

3.1.1.1. Hefen (Saccharomyces Stamm 211) (20) wurden im 5 l Fermenter bei 30 C unter Rühren auf eine optische Dichte (OD) von 0,55 bei 600 nm gezüchtet, d.h. in die späte logarithmische Phase. Anschließend wurden sie in Eis gekühlt und bei 1000-1500 g 10 min abzentrifugiert, zweimal in TMA-A-Puffer pH 8,0 gewaschen* und bei -50 C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

3.1.1.2. Bakterien (E-coli Stamm 514) wurden vom Institut für Biotechnologie und Gärungsgewerbe** gezüchtet. Die Zellen wurden im 100 l NBS-Fermenter bei 30 C auf eine OD von 0,4 bis 0,5 bei 600 nm gezogen, in Eis gekühlt bei 10-20 000 g 10 min abzentrifugiert und bei -50 C aufbewahrt. Vor der Verarbeitung wurden sie zweimal mit TMA-I Puffer pH 7,8 gewaschen.

3.1.2. Isolierung der Zellfraktionen und Versuche zur Peptidsynthese mit ^{14}C-Phenylalanin

wurden für Hefen nach Uttech (17) und Schulz-Harder (21) durchgeführt. Die Bestimmung des Einbaus von ^{14}C-Phe in das Peptid erfolgte nach Schulz-Harder (21). Bakteriensysteme wurden nach Nomura und Erdmann (22) behandelt. Soweit Änderungen an diesen Vorschriften vorgenommen wurden, sind sie im Kapitel "Optimierung des biochemischen Systems" (s. Abschn.4) dargestellt.

---

* Tabelle mit verwendeten Medien und Puffern und MIX-Sorten s. Anhang II

** Institut für Biotechnologie und Gärungsgewerbe der Technischen Universität Berlin, Seestraße 13

3.1.3. Die Bestimmung der Konzentration an ribosomalem Protein in der Ribosomenfraktion

wurden nach Arighaus und Ascione (23) durchgeführt.

3.1.4. Probleme der mikrokalorimetrischen Messungen

Die mikrokalorimetrischen Messungen wurden mit einem Mikrokalorimeter vom Typ E.Calvet (24) durchgeführt. Eine genaue Beschreibung der Meßanordnung und -genauigkeit des Gerätes ist in der Dissertation von Lamprecht (25) gegeben. Das verwendete Mikrokalorimeter hat 4 Zellen à 15 ml. Die Anzeigeempfindlichkeit betrug zwischen 22 und 26 cm Schreiberauslenkung pro mW Leistung. Jede Mikrokalorimeterzelle wurde mit einer Kunststoffkammer à 11 ml beschickt. Zwei kleine Becher à 0,5 ml in jeder Kammer erlaubten die Auftrennung der zur PBS essentiellen Faktoren in drei Fraktionen. Abbildung 1a-1c gibt schematisch den Längsschnitt durch eine solche Kalorimeterzelle wieder. Zum Start der Reaktion wurden die Fraktionen entweder durch Rühren oder durch Durchstoßen der Becherböden gemischt. Um ein möglichst gutes Durchmischen zu gewährleisten, wurden mehrere Bechertypen getestet. Abbildung 1a zeigt die erste verwendete Becherform mit flachem Boden. Es stellte sich heraus, daß sich an den Böden beim Eintauchen Luftblasen bildeten. Diese Blasenbildung erfolgte ungleich in Reaktions- und Referenzgefäß und zwar von Versuch zu Versuch unterschiedlich, so daß die dabei auftretenden Wärmen die Thermogramme störend beeinflußten. Dieser Effekt wurde dadurch ausgeschlossen, daß die Becherböden konisch geformt wurden (s. Abb.1b). Bei beiden Bechertypen bestand jedoch ein weiteres Problem. Durch die Adhäsionskräfte in den Bechern kam es vor, daß die Substanzen nicht vollständig vermischt wurden sondern eine konzentrierte Schicht am Becherboden haften blieb. Dieser Effekt wurde dadurch beseitigt, daß Becher konstruiert wurden, deren Boden auswechselbar war.

D.h. zum Mischen der Fraktionen wurde der Becherboden durchgestoßen und fiel mit in das Reaktionsgefäß (Abb.1c).

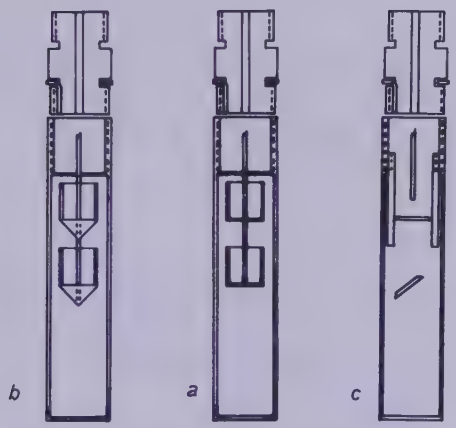


Abb. 1a-c Kalorimeterzelle mit Rührvorrichtungen

1a: mit flachem Becherboden
1b: mit konisch geformtem Becherboden
1c: mit durchstoßbarem Becherboden

Bei dieser Methode der Mikrokalorimetrie sind folgende Punkte besonders zu beachten, die zu einer Störung der Thermogramme führen können:

3.1.4.1. Die Reibungswärme, die beim Rühren und mechanischen Mischen entsteht.

3.1.4.2. Die Lösungs- und Mischungswärme, die durch Mischen der drei Fraktionen beim Start der Reaktion entsteht.

3.1.4.3. Die Dissoziations- bzw. Protonisationswärme, die beim Mischen von Fraktionen mit verschiedenem pH-Wert auftritt.

Zu 3.1.4.1.

Beim verwendeten Mikrokalorimeter ist jeder Meßkammer eine Referenzkammer zugeordnet. Als Meßgröße wird die Differenz der Wärmeflüsse der beiden Kammern genommen (24,25).

Um den oben beschriebenen Effekt aufzuheben, wurde für die Referenzkammer dieselbe Becheranordnung wie für die Meßkammer gewählt. Die Refenzkammer wurde mit Puffer gefüllt und ihr Inhalt gleichzeitig mit dem der Meßkammer gerührt.

Zu 3.1.4.2.

Eine Überprüfung durch Mischen der verschiedenen essentiellen Komponenten der PBS im Mikrokalorimeter ergab, daß in dieser differentiellen Anordnung Lösungs- und Mischwärmen der verwendeten Fraktionen nicht nachweisbar sind*.

Zu 3.1.4.3.

In Abbildung 2 ist die beim Mischen abgegebene Wärme als Funktion der pH-Wert-Differenz der verschiedenen Fraktionen dargestellt. Schon relativ geringe pH-Wert-Differenzen führen zu erheblicher Wärmetönung. Eine solche Wärmetönung konnte durch Einstellen eines einheitlichen pH-Wertes (pH 7,5) in den verschiedenen Fraktionen ausgeschlossen werden**.

---

* Siehe Abschnitt 5 "Untersuchungen zur Verwertbarkeit des biochemischen Systems für das Mikrokalorimeter" Tabelle 5

** Da bei den Systemen von Uttech der pH-Wert der isolierten Fraktionen nicht einheitlich eingestellt war, ist zu vermuten, daß ein Teil des ersten Peaks der von ihr erhaltenen Thermogramme auf Dissoziations- bzw. Protonisationswärme zurückzuführen ist.

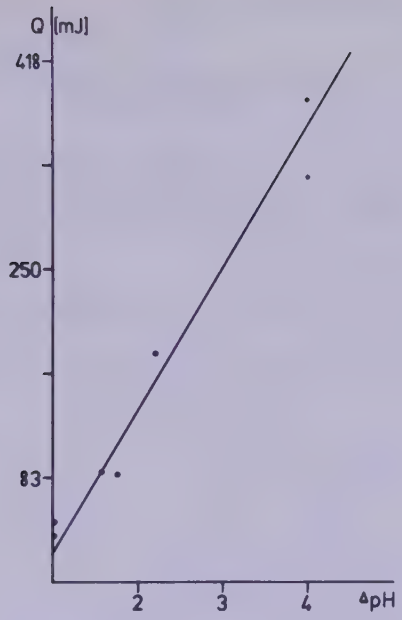


Abb. 2 Abhängigkeit der Lösungs- und Mischwärme von der pH-Wert-Differenz

3.2. Material

Im Anhang II sind alle verwendeten Chemikalien sowie die Bezugsfirmen aufgeführt.

4. Optimierung des biochemischen Systems

4.1. Isolierung und Reinigung der zellfreien Komponenten für die ^{14}C-Phenylalaninsynthese

Bei der Isolierung von Ribosomen - und Enzymfraktion (RF, EF) wurde von der Dissertation von Uttech (17) ausgegangen. Schema 1 zeigt den Isolierungsgang.

Als Test auf die Reinheit der Ribosomen wurde die Sedimentation im Sucrosegradienten verwendet. Abbildung 3 zeigt ein Sedimentationsprofil für nach Uttech isolierte Ribosomen.

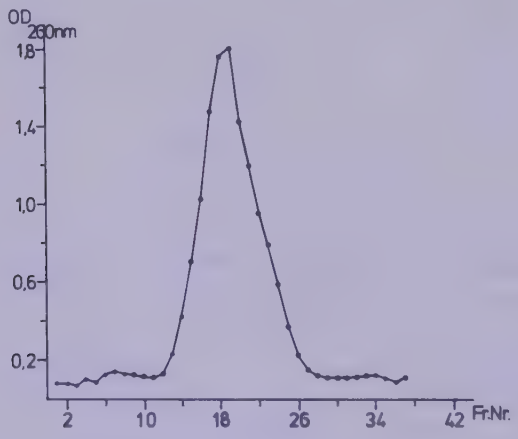


Abb. 3 Sedimentationsprofil von nach Uttech isolierten Ribosomen

Zentrifugation im 5-50% Sucrosestufengradienten, 5 h im Schwingbecherrotor SW 39 bei 25 000 rpm (= 68475 g)

Schema 1

Isolierung nach Uttech

x g Hefe (Feuchtmasse) werden mit TMA-B Puffer (pH 7,5) (2 x ml) 2 min im Braun Homogenisator bei 0 C mit Glasperlen Ø 0,45-0,5 mm homogenisiert. Die Glasperlen werden auf einer Fritte 17 G 1 mit 1 ml Puffer pro g Hefe gespült, das Homogenat mehrfach zentrifugiert (alle Zentrifugationen bei 0-4 C).

10 min bei 1500 g zentrifugiert

Niederschlag verwerfen

Niederschlag verwerfen

Überstand = rohe Enzymfraktion

auf Sephadex G75 Säule geben
Ø 2,5 cm, Höhe 15-25 cm
5 ml EF roh auftragen
spülen mit TMA-B Puffer

optische Dichte bestimmen (260,268 nm) und Anteile mit größter Proteinmenge mischen

10 min bei 30 000 g zentrifugieren

Überstand bei -50 C in Portionen einfrieren

Überstand zentrifugieren:
20 min bei 30 000 g

60 min bei ungef. 300 000 g zentifug.
Niederschlag = rohe Ribosomenfrakt.

1 mal in TMA-B Puffer aufnehmen

60 min bei ungef. 300 000 g zentrifugieren

Niederschlag auflösen, auf OD_{260} = 400 einstellen

10 min bei 30 000 g zentrifugieren

Überstand in Portionen bei -50 C einfrieren

Die von Uttech beschriebene Isolierungsmethode hatte den Nachteil, daß im Poly-U abhängigen System I die max. Einbaurate von ^{14}C-Phe und die Abhängigkeit des Einbaus von essentiellen Faktoren nur bedingt reproduzierbar waren.

Ähnliche Effekte, wie sie in diesem System gefunden wurden, waren auch schon von anderen Autoren beschrieben worden (26, 27).

Richter und Klink fanden eine Inhibition der Peptidsynthese durch Enzyme des 100 000 g Überstandes. Sie beobachteten einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Reinheit der Mikrosomen und Hemmung durch Überstandsenzyme.

Um 1. die Inhibition durch Überstandsenzyme zu beseitigen und 2. die Komponentenabhängigkeit zu verbessern, wurden folgende Isolierungs- und Reinigungsmethoden getestet.

4.1.1. Änderung des pH-Wertes des Isolierungspuffers

Von Schulz-Harder (21) wird der Einfluß von Schwankungen des pH-Wertes während der Komponentenisolierung auf die Aktivität des Systems beschrieben. Bei einer Änderung des pH-Wertes des Isolierungspuffers von pH 7,5 auf pH 8,0 ließ sich keine Inhibition des Einbaus durch Überstandsenzyme mehr finden. Die Rate der Stimulierung des ^{14}C-Phe Einbaus schwankte im Mittel um 40 %. Im folgenden werden Systeme, die nach Schema 1 jedoch mit einem pH-Wert von pH 8,0 isoliert wurden, als System II bezeichnet.

4.1.2. Änderung der Isolierungs- und Reinigungsmethode für Ribosomen

Seit einigen Jahren weiß man, daß in eukaryontischen Zellen freie und membrangebundene Ribosomen vorkommen (28, 29). Ihre Existenz hängt von der Stoffwechselaktivität der Zelle ab. Untersucht wurden vor allem Säugerzellen wie Rattenleberzellen (30, 31). Überträgt man diese Ergebnisse von Venkatesan und Steele (30) sowie von Hanna et al. (31) auf Hefen, so bedeutet das, daß in der logarithmischen Wachstumsphase der größte Teil der Ribosomen membrangebunden vorliegen muß. Untersuchungen von Lochmann* zeigen jedoch, daß in der stationären Wachstumsphase 60 % Ribosomen frei und 40 % an Membranstücke gebunden, also als Mikrosomen,vorliegen. In der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600}= 0,5-0,6) sind jedoch ungefähr 25 % der Ribosomen an Membranstücke gebunden.

Für Untersuchungen im Mikrokalorimeter ist ein Anteil von 25 % membrangebundener Ribosomen zu hoch. Die Ribosomen müssen möglichst frei von Membranstücken sein, da enzymatische Prozesse, die eventuell in der Membran ablaufen, ebenfalls mit einer Wärmetönung verbunden sind. Das führt zu einer Überlagerung und Verfälschung der Thermogramme der PBS. Schema 2 zeigt eine Isolierungsmethode, bei der durch hohe Kaliumchlorid (KCl)-Konzentration (200mM) und zusätzliche Detergentienbehandlung (Brij 58) die am Ribosom hängenden Membranstücke abgelöst werden (21)**. Abbildung 4 S. 18 gibt ein Sedimentationsprofil von derart gereinigten Ribosomen und zum Vergleich dazu in Untereinheiten zerlegten Ribosomen wieder.

---

*

**E.-R. Lochmann mündliche Mitteilung

Im folgenden werden die Systeme, bei denen die Ribosomen nach Schema 2 und die EF nach Schema 1 isoliert sind, als System II bezeichnet.

Wie im Kapitel 7 "Enzymreaktionen am Ribosom" noch genauer ausgeführt wird, gibt es eine Reihe von Enzymen, die am Ribosom hängen bzw. an das Ribosom gebunden sind.

Schema 2:

Ribosomenisolierung und -reinigung

x g Hefe (Feuchtmasse) werden mit Puffer R1 (xml) 1 min homogenisiert im Braun Homogenisator, bei 0 C (pro Flasche 40 ml Glasperlen Ø 0,45 -0,5 mm). Die Glasperlen werden auf einer Glasfritte 17 G 1 mit 2/3 x ml Puffer R1 gespült. Das Homogenat mehrfach zentrifugiert, (alle Zentrifugationen bei 0-4 C).

10 min bei 1500 g (4000 rpm Christ Kühlzentrifuge)

Niederschlag verwerfen

Überstand zentrifugieren:
20 min bei 30 000 g, dann ohne Lauf zu beenden
10 min bei 48 000 g

Niederschlag verwerfen

Überstand zentrifugieren:
70 min bei 300 000 g

Überstand verwerfen

Niederschlag = rohe Ribosomenfraktion (Mikrosomen), festes Pellet

Im Eisbad pro Pellet, Mikrosomen mit 5 ml 2% Brij 58 Lösung (Puffer R1) lösen, dann mit Puffer R1 auf 1% Brij 58 Lösung einstellen. Die Mikrosomenfraktion im Handhomogenisator durch 10-maliges Reiben lösen.

Diese Mikrosomenlösung wird auf einen Sucrosestufengradienten aufgetragen.

Mengenverhältnisse: 8 ml 1,5 M Sucrose (gelöst in Puffer R2)
8 ml 1,0 M Sucrose (gelöst in Puffer R2)
20 ml Mikrosomenlösung (gelöst in Puffer R1 mit 1% Brij 58)

Der Stufengradient wird 16-18 Stunden bei 136 000 g im Schwingbecherrotor SW 27 zentrifugiert. Das Ribosomenpellet wird in 2 ml Puffer R_3 gelöst. Von der Ribosomenlösung wird der Gehalt an Protein (280 nm) und an Nucleinsäuren (260 nm) bestimmt. Zum Einfrieren der Portionen bei -50 C wird die Lösung auf eine optische Dichte von OD_{260}= 400 eingestellt.

Um lose am Ribosom hängende Enzyme abzulösen, wurden die Ribosomen teilweise mit Ammoniumchlorid gewaschen oder über Sucrosekissen 1-2 M zentrifugiert *. Diese Reinigungsschritte sind jedoch nicht gesondert aufgeführt sondern an den entsprechenden Stellen vermerkt.

---

* Im 2 M Sucrosekissen bleiben membrangebundene Ribosomen hängen.

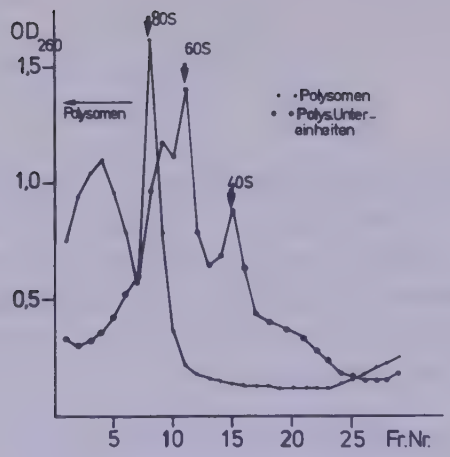


Abb. 4 Sedimentationsprofil von nach Schema 2 isolierten Ribosomen

Zentrifugation im 5-50% Sucrosestufengradienten, 8 h bei 27 000 rpm (= 136 000 g) im Sw 27 Rotor bei 15 C

4.1.3. Reinigung der Enzymfraktion (System IV)

Bei fast allen Versuchen, bei denen der 100 000 g Überstand, d.h. die rohe Enzymfraktion (EF_{roh}) zur Reinigung über eine Sephadex G-75 Säule getrennt wurde, bewirkte die Zugabe der gereinigten Enzymfraktion nur eine geringe Stimulierung der Peptidsynthese (ungef. 30%) *. Schulz-Harder hat diese Erscheinung in seiner Diplomarbeit (21) untersucht. Durch Fällung der rohen EF mit 30% und 60% Ammoniumsulfat (s. Schema 3, S. 20) konnte die Stimulierung verbessert werden (ungef. 60%) **.

---

* Schulz-Harder stellte fest, daß in der EF von System I noch t-RNS vorhanden war.

** Gewinnung der EF mit Ammoniumsulfatbehandlung s. Schema 3 S. 20

Auf eine weitere Reinigung der EF nach Lagerkvist und Waldenström (32), Makmann und Cantoni (33) und Fasiolo et al. (34) wurde in der hier vorliegenden Arbeit verzichtet. Es ging nicht darum, reine Phenylalanylsynthetase einzusetzen, sondern Synthetase, die im Mikrokalorimeter keine Nebenreaktionen erzeugt. Es konnte nachgewiesen werden, daß die in der EF vorhandenen Enzyme im Mikrokalorimeter keine Reaktionen zeigten, die parallel zur PBS ablaufen *. Zum anderen lagen keine Untersuchungen darüber vor, inwieweit essentielle Initiationsfaktoren am Ribosom oder in der EF zu erwarten waren.

4.2. Aktivitätsbestimmung der isolierten Fraktionen

4.2.1. Komponentenabhängigkeit

Die Güte der isolierten Fraktionen wurde im Poly-U System getestet, indem die Komponentenabhängigkeit aufgenommen wurde. In Abbildung 5 sind drei verschiedene Systeme miteinander verglichen. Es zeigte sich bei allen Systemen, daß die isolierten Ribosomen auch ohne EF noch Peptidsynthese leisten.

---

* Siehe Kapitel: Untersuchungen zur Verwertbarkeit des biochemischen Systems für das Mikrokalorimeter, besonders Abschn. 5.1.4.

Schema 3:

Enzymgewinnung durch Ammoniumsulfatfällung

x g Hefe (Feuchtmasse) werden suspendiert in 0,33 ml TMA-A Puffer/ g Hefe dann 1,5 min homogenisiert im Braun Homogenisator bei 0 C (pro Flasche 40 ml Glasperlen Ø 0,45-0,5 mm), danach auf einer Glasfritte 17 G 1 abgenutscht und mit 2 mal 0,33 ml Puffer TMA-B pro g Hefe gewaschen (alle Zentrifugationen bei 0-4 C).

10 min bei 1500 g zentrifugieren

↓ Niederschlag verwerfen

Überstand zentrifugieren:

20 min bei 30 000 g

↓ Niederschlag verwerfen

Überstand zentrifugieren:

70 min bei 300 000 g

↓ Niederschlag verwerfen

Überstand = EF_{roh} auffüllen mit 33 ml Puffer TMA-B / g Hefe. Dieses Gemisch fällen mit $(NH_4)_2SO_4$ bis zu einer 30%-igen Lösung im Eisbad unter ständigem Rühren. dann:

10 min bei 25 000 g zentrifugieren

↓ Niederschlag verwerfen

Überstand weiter fällen mit $(NH_4)_2SO_4$ bis zu einer 60%-igen Lösung im Eisbad unter ständigem Rühren.

Niederschlag lösen in TMA-B Puffer mit 1,3 ml Puffer pro g Hefe. Diese Lösung dann 2 mal 8h gegen je 1 l TMA-B Puffer pro 50 ml Enzymlösung dialysieren. Danach wird der Gehalt an Protein (280 nm) und Nucleinsäure (260 nm) bestimmt, in Portionen bei -50 C einfrieren.

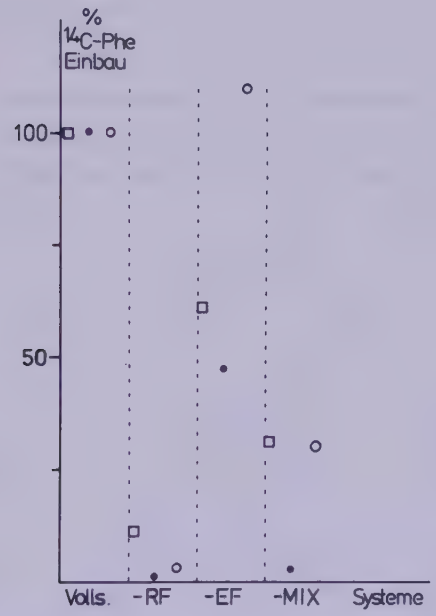


Abb. 5 Fraktionsabhängigkeit des ^{14}C-Phenylalanineinbaus, drei verschiedene Isolierungen:

○ Isolierung nach Uttech mit Puffer pH 7,5 (System I),
□ Isolierung nach Uttech Isolierungspuffer pH 8,0 (System II),
● Isolierung der EF mit Ammoniumsulfatfällung (System III)

Systeme, bei denen die Stimulierung der Peptidsynthese durch die EF weniger als 50% betrug, wurden nicht zu mikrokalorimetrischen Messungen verwendet. Bei Systemen, die nach variierten Methoden (System II-IV) isoliert wurden, zeigte es sich, daß der Einbau

von ^{14}C-Phe höher war als in nach Uttech (System I) isolierten. Die Komponentenabhängigkeit war ebenfalls besser (s. Abb. 5). Im mikrokalorimetrischen Experiment war die gesamte Wärmeabgabe dieser Systeme jedoch erheblich geringer als die des Systems I (s. Abb. 9,12).

4.2.2. Abhängigkeit des Einbaus von der Menge an zugeführten Triphosphaten (MIX)

Aus Abbildung 6 ist ersichtlich, daß die Peptidsynthese nicht monoton mit zunehmendem Angebot an MIX steigt, sondern daß ein optimaler Bereich zwischen 0,1 mM ATP, 0,1 mM GTP und 0,5 mM ATP, 0,5 mM GTP zu finden ist.

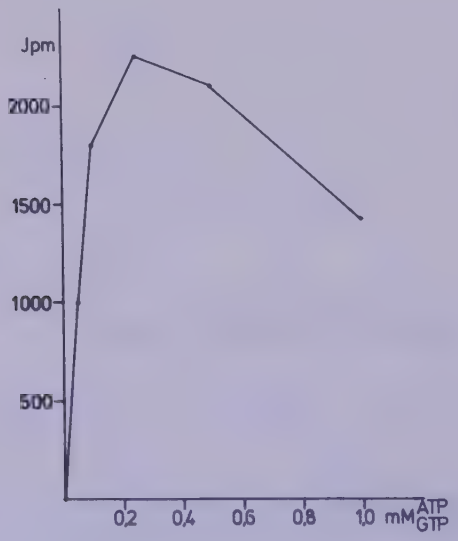


Abb. 6 Abhängigkeit der ^{14}C-Phe-Peptidsynthese vom MIX im System nach Uttech (System I)

MIX IIa: 7,5 mg ATP, 7,5 mg GTP, 12,5 mg PeP pro ml H_2O bidest. 25 µl PeP-kinase, pH-Wert 7,5

Aus Ergebnissen von Schulz-Harder wurde ein MIX mit neuen Konzentrationen übernommen*, der ebenso gute Syntheseraten ergab wie MIX IIa, jedoch wesentlich weniger kostenintensiv war**. Er fand in System 3 und 4 Verwendung. Die ATP-Konzentration wurde auf 20 mM gesteigert, die GTP-Konzentration auf 3 mM gesenkt.

---

* Optimierungskurven von Schulz-Harder unveröffentlicht.

** Die Kostenfrage tritt bei mikrokalorimetrischen Experimenten immer auf, bedenkt man, daß im Vollsystem pro Ansatz das Reaktionsvolumen 5 ml beträgt - davon sind 0,5 ml MIX.

5. Untersuchung zur Verwertbarkeit des biochemischen Systems für das Mikrokalorimeter

Da grundsätzliche methodische Unterschiede zwischen den Versuchsanordnungen zum biochemischen und zum mikrokalorimetrischen Test bestehen, sollen sie hier kurz erwähnt werden.

5.1. Methodische Unterschiede

Die Inkubationstemperatur im biochemischen Ansatz beträgt 30 C. Die Inkubationstemperatur im mikrokalorimetrischen Ansatz beträgt 20 C, da bei der längeren Temperierungszeit bei 30 C die Zellfraktionen an Aktivität einbüßen würden. Es wurde getestet, bei welcher Temperatur tiefer als 30 C die Peptidsynthese noch abläuft, die Fraktionen jedoch während der Temperierungszeit keinen Aktivitätsverlust aufweisen.

Beim biochemischen Versuch werden die Substanzen getrennt bei 0 C aufbewahrt und erst zu Inkubationsbeginn zusammengegeben. Beim mikrokalorimetrischen Versuch werden t-RNS, EF, m-RNS und Poly-U zusammen und Ribosomenfraktion und MIX getrennt ungefähr 40 min bei Reaktionstemperatur vortemperiert.

Bei der biochemischen Methode des Nachweises synthetisierter Peptide wird die Gesamtmenge an Peptid nach einer definierten Zeit bestimmt. Bei der kalorimetrischen Methode wird der Prozess der Peptidsynthese insgesamt verfolgt. Eine Aussage über die Menge an synthetisiertem Peptid ist aus den Thermogrammen nicht möglich.

Beim biochemischen Ansatz stören enzymatische Reaktionen, die parallel zur PBS ablaufen, nicht, sofern sie nicht die PBS inhibieren. Bei der kalorimetrischen Methode stören solche Reaktionen, da alle chemischen Reaktionen mit einer Wärmetönung verbunden sind.

5.1.1. Bestimmung der optimalen Versuchstemperaturen im Mikrokalorimeter

Um einen Vergleich zwischen den verschiedenen Reaktionsgeschwindigkeiten zu haben, wurde der Einbau von ^{14}C-Phe in Abhängigkeit von der Temperatur und der Zeit getestet. Aus Abbildung 7 kann man entnehmen, daß es nicht sinnvoll wäre, die Peptidsynthese bei 0 C und bei 10 C ablaufen zu lassen, da nur geringe ^{14}C-Phe Einbauraten erreicht werden können. Die Synthese läuft nur sehr langsam ab bzw. stoppt nach kurzer Zeit. Bei 20 C jedoch verläuft die Reaktion zwar langsamer als bei 30 C, erreicht jedoch ungefähr denselben Gesamteinbau.

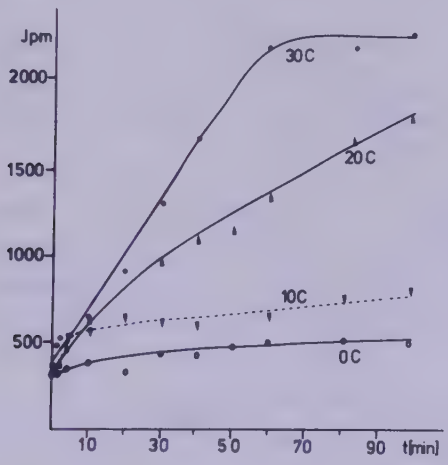


Abb. 7 Kinetik des ^{14}C-Phe-Einbaus in Abhängigkeit von der Temperatur

5.1.2. Bestimmung der Aktivitätsverluste der Fraktionen durch Vortemperieren

Um zu testen, ob durch Präinkubation bei 20 C für 20 bis 40 min die Aktivität der Fraktionen verlorgen geht, wurden in verschiedenen Kombinationen Ansätze gemacht, bei denen die Fraktionen

vom Start der Reaktion 20 min bei 20 C gelagert wurden. In Abbildung 8 sind die Einbauraten als Funktion der Präinkubationszeit aufgetragen. Es zeigt sich, daß durch Präinkubation bei 20 C die Peptidsyntheserate zwar vermindert ist, jedoch noch in ausreichendem Maße abläuft (50 -70% des Einbaus nicht präinkubierter Systeme).

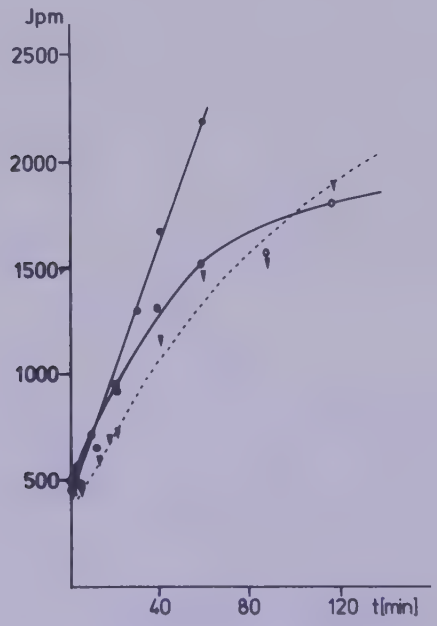


Abb. 8 Kinetik der ^{14}C-Phe-Aufnahme in Abhängigkeit von der Art der Präinkubation (System II).

▼ Alle Fraktionen ohne ^{14}C-Phe 20 min bei 20 C präinkubiert, Start der Reaktion durch Zugabe von ^{14}C-Phenylalanin

○ ^{14}C-Phe + MIX IIa + t-RNS + Poly-U + EF in Puffer zusammen 20 min bei 20 C präinkubiert, Start der Reaktion durch Zugabe von RF

● Kinetik der PBS ohne Vorbehandlung

5.1.3. Nachweis der Peptidsynthese im Mikrokalorimeter mit Hilfe von ^{14}C-Phenylalanin

Um nachzuweisen, daß tatsächlich Peptidsynthese im Mikrokalorimeter abläuft, wurden Systeme mit ^{14}C-Phe in das Mikrokalorimeter gegeben und nach Ablauf der Reaktion, d.h. wenn die Wärmetönung abgeklungen war, die Einbaurate bestimmt. Es zeigte sich, daß die Einbaurate ungefähr 50% des Einbaus des biochemischen Ansatzes ohne Präinkubation betrug.

5.1.4. Test der verwendeten Fraktionen auf ihr Verhalten im Mikrokalorimeter

Da im Mikrokalorimeter alle ablaufenden Reaktionen registriert werden und nicht nur die erwünschte Peptidsynthese, wurde untersucht, welche Kombination von Reaktionen eine Wärmetönung hervorruft.

Betrachtet man den Inkubationsansatz, bei dem t-RNS, Poly-U, Phe und EF zusammen in einem Gefäß sind, während RF und MIX zum Start der Reaktion zugegeben werden, so erhält man für die Reaktionsmöglichkeiten* folgendes Schema:

---

*Reaktionsmöglichkeit ist hier im weiteren Sinne zu verstehen. Das Schema beinhaltet nicht nur chemische Reaktionen, sondern auch Komplexbildung, da solche Komplexbildungen ebenfalls mit Wärmetönung verbunden sind.

	EF	RF	MIX	t-RNS	Poly-U	Phe	t-RNS, Phe Poly-U, EF
EF	-	+	+	-	-	+	-
RF	+	-	+	+	+	+	+
MIX	+	+	-	-	-	-	+
t-RNS	-	+	+	-	-	+	-
Poly-U	-	+	-	-	-	-	-
Phe	+	+	-	+	-	-	-

Schema 4: Reaktionsmöglichkeiten der zur Proteinbiosynthese essentiellen Faktoren

+ Reaktion möglich, - Reaktion nicht möglich

Entsprechend diesem Schema wurden Tests im Mikrokalorimeter durchgeführt. Aus Schema 5 ist zu entnehmen, welche dieser Kombinationen im Mikrokalorimeter zu einer messbaren Wärmetönung führt.

Es zeigt sich, daß nur Kombinationen, die sowohl RF als auch MIX enthalten, zu Wärmeproduktion führen. Eine Ausnahme ist die Reaktion von Phe, EF, t-RNS, Poly-U mit MIX, die endotherm abläuft.

	EF	RF	MIX	t-RNS	Poly-U	Phe	t-RNS, Phe Poly-U, EF	Poly-U, Phe t-RNS, MIX
EF	-	-	-	-	-	-	-	+
RF	-	-	+	-	-	-	-	+
MIX	-	+	-	-	-	-	+	-
t-RNS	-	-	-	-	-	-	-	-
Poly-U	-	-	-	-	-	-	-	-
Phe	-	-	-	-	-	-	-	-

Schema 5: Reaktionen der zur Proteinbiosynthese essentiellen Faktoren

+ Wärmetönung im Mikrokalorimeter nachweisbar
- Keine Wärmetönung nachweisbar

Versuche zur Komponentenabhängigkeit im biochemischen Ansatz haben ebenfalls gezeigt, daß ohne RF und ohne MIX die Peptidsynthese nicht oder nur sehr vermindert stattfinden kann (Abb.5 S. 21).

Diese Tatsache allein ist jedoch kein Beweis dafür, daß die mit Hilfe des Mikrokalorimeters festgestellte Wärmeabgabe tatsächlich auf PBS zurückzuführen ist. Sie kann ebenso durch enzymatische Prozesse am Ribosom verursacht werden.

Um weitere Aufschlüsse über das PBS-System zu bekommen, wurde ähnlich wie im biochemischen Versuch die Komponentenabhängigkeit der Reaktion getestet.

5.2. Komponentenabhängigkeit

5.2.1. Abhängigkeit von der Enzymfraktion (System I)

In Abbildung 9 sind Thermogramme verschiedener Vollsysteme dargestellt. Es zeigt sich, daß hier ähnlich wie beim Ansatz mit ^{14}C-Phe alle Versuche einen typischen Verlauf zeigen, jedoch nicht genau reproduzierbar sind. Allen Thermogrammen gemeinsam ist jedoch, daß sie exotherm ablaufen.

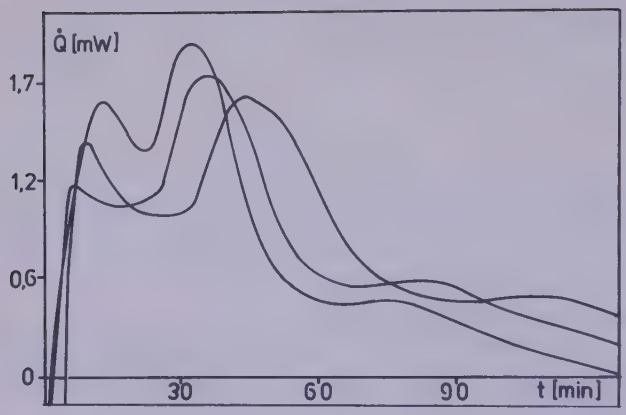


Abb. 9 Thermogramme von Hefevollsystemen (System I) drei verschiedener Präparationen

In Abbildung 10 sind Thermogramme zu sehen, bei denen essentielle Faktoren fehlen. Es zeigt sich, daß in diesem System ohne EF die Wärmeabgabe erheblich verringert ist. Daraus kann man zwei Schlüsse ziehen:

- Wie im biochemischen Ansatz gezeigt, wird die Peptidsynthese durch Zugabe von Enzymen stimuliert.
- In der EF sind Substanzen vorhanden, die parallel zur PBS ablaufende Reaktionen verursachen und Wärme produzieren*.

---

* Tests im System I und II haben ergeben, daß eine Mischung aus EF, AS und MIX zusammen Wärme produziert. Bei einem Ansatz von 3ml EF (G 75), 0,5 ml Phe (0,2 µM/ml), 0,5 ml t-RNS (1 mg/ml) und 0,5 ml MIX IIa ergibt sich eine Wärmetönung von ungefähr $522 \cdot 10^{-3}$J.

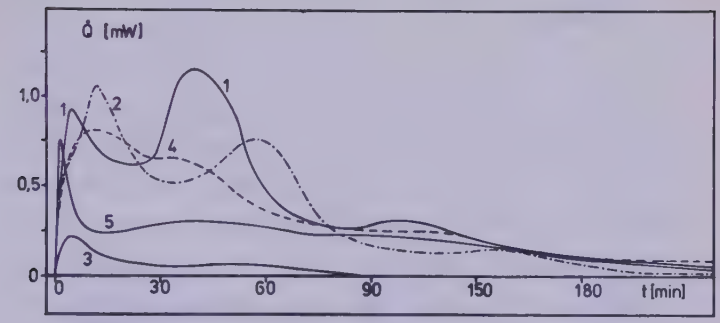


Abb. 10 Abhängigkeit des Thermogrammverlaufs von der Zugabe essentieller Faktoren in System I

1: Vollsystem (alle essentiellen Faktoren),
2: Vollsystem ohne Poly-U, 3: Ohne MIX IIa,
4: Ohne EF, 5: Nur Ribosomenfraktion und MIX IIa

5.2.2. Abhängigkeit vom MIX

Um festzustellen, ob (im System I) die Reaktionen, die für die Thermogramme verantwortlich sind, tatsächlich vom MIX abhängen, wurde die von einem Vollsystem insgesamt abgegebene Wärme als Funktion des MIX gemessen (Abb. 11). Die Auftragung zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen Wärmeproduktion und MIX-Konzentration.

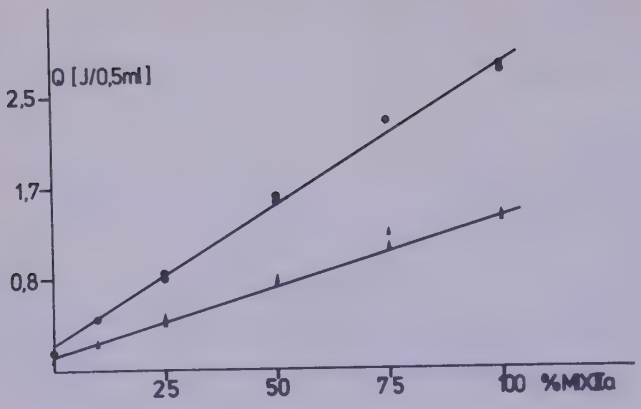


Abb. 11 Abhängigkeit der insgesamt abgegebenen Wärme von der MIX IIa-Konzentration, zwei verschiedene Präparationen des Systems I

5.2.3. Abhängigkeit der insgesamt abgegebenen Wärmemenge von der Menge an Ribosomen (System II, III).

Aus Schema 5 S.28 ist zu entnehmen, daß MIX und RF zusammen exotherm reagieren. Ebenso wie die insgesamt abgegebene Wärme mit der Menge an MIX zunimmt, nimmt sie auch mit der Menge an Ribosomen zu, die dem System zugeführt werden (s. Abschn. 5.3.4.).

5.3. Vergleich der Systeme I bis IV (d.h. Systeme nach Uttech mit modifizierten Isolierungs- und Reinigungsformen)

Bei allen Systemen, die nach einer modifizierten Methode* isoliert wurden, traten einige in System I beschriebenen Effekte nicht auf.

---

* Systeme II bis IV: s. S. 12 ff

5.3.1. Thermogramme von Vollsystemen

Die Thermogramme der Vollsysteme sind nicht mehr nur exotherm wie in System I sondern in einen endothermen und einen exothermen Teil gegliedert.

Wie schon bei einigen Vergleichsversuchen mit Poly-U abhängigen Phe-synthetisierenden Systemen aus E.coli zeigte sich auch in den Hefesystemen eine Zweiteilung des Thermogramms. In Abbildung 12 sind Vollsysteme aus Hefen und Bakterien dargestellt. Es läßt sich daraus eindeutig erkennen, daß mindestens zwei Prozesse mit entgegengesetzter Wärmetönung ablaufen. Da in den hier verwendeten Bakteriensystemen Peptidsyntheseraten erzielt wurden, die, mindestens nach dem Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren zu urteilen, um den Faktor 10 größer waren als die von Hefesystemen*, wäre eine enorme Steigerung der Wärmeabgabe zu vermuten gewesen. Die Tatsache, daß dieses nicht der Fall ist, läßt jedoch darauf schließen, daß in den Systemen, in denen rein exotherme Thermogramme erzielt wurden, noch exotherme Prozesse parallel zur PBS abliefen.

5.3.2. Abhängigkeit des Thermogrammverlaufs von der Enzymfraktion

Der Kurvenverlauf wird nur noch gering von der Menge an zugegebenen Enzymen beeinflußt (Abb. 13), obwohl die Syntheserate

---

*Isolierung der Zellkomponenten und Inkubationsansatz in zellfreien Systemen von E.coli wurden nach Nomura und Erdmann (22) sowie nach mündlichen Mitteilungen von Erdmann durchgeführt. Folgende Komponentenabhängigkeit des Systems ergab sich: Vollsystem 100%, -EF 30%, -Poly-U 12%, -MIX 10%. Der Einbau des Vollsystems betrug 78 000 Ipm entsprechend ungefähr $6 \cdot 10^{-6}$ Mol AS pro Ansatz.

ohne Enzymzugabe nur ungefähr 40% beträgt. Das läßt darauf schließen, daß die registrierte Kurve zum größten Teil von anderen Prozessen als der PBS verursacht wird.

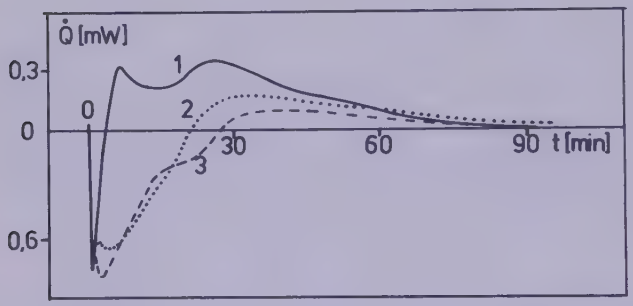


Abb. 12 Thermogramme von Vollsystemen aus Hefe- und Bakteriensystemen

1: Hefevollsystem (System II), spez. Aktivität 5 900 Ipm
2: Bakterienvollsystem nach Nomura und Erdmann (22), Ribosomen jedoch nicht über ein 2M Sucrosekissen zentrifugiert, sondern mit TMA-I Puffer gewaschen.
3: Bakterienvollsystem nach Nomura und Erdmann (22), d.h. über 2M Sucrosekissen zentrifugiert, spez. Aktivität 78 000 Ipm

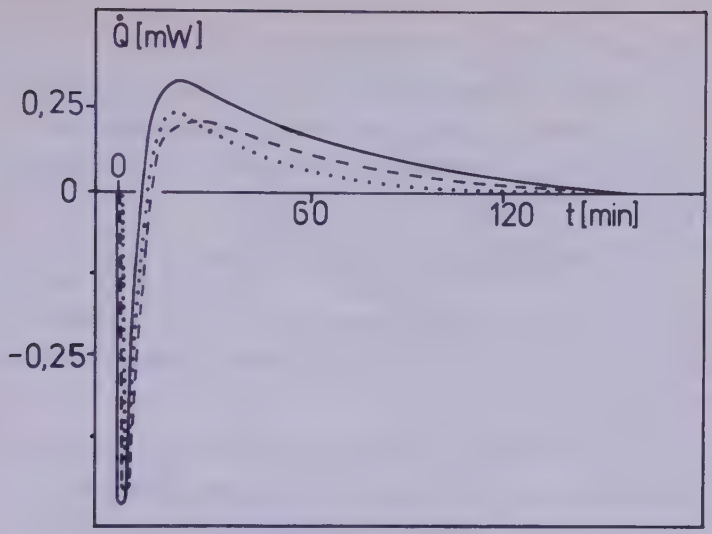


Abb. 13 Thermogrammverlauf eines Hefevollsystems (System II) in Abhängigkeit von der EF-Menge

—2 ml EF, - - - 1 ml EF, ●●● 0,5 ml EF, ●●● 0 ml EF

Das Weglassen der Enzymfraktion hat auf den Thermogrammverlauf deshalb kaum Einfluß, weil die Ribosomenfraktion mit genügend Synthetasen verunreinigt zu sein scheint.

5.3.3. RNS- und phosphatspaltende Enzyme am Ribosom

Untersuchungen von Schulz-Harder (21) und Lother (35) weisen darauf hin, daß bei den verwendeten Isolierungsmethoden die Ribosomenfraktion sowohl RNS-spaltende als auch phosphatspaltende Enzyme enthält. Zusammen mit den Ergebnissen des Schema 5 ließen diese Angaben die Vermutung aufkommen, daß an den Ribosomen enzymatische Prozesse ablaufen, die zwar den Einbau von ^{14}C-Phe im in vitro System nicht stark beeinflussen, jedoch mit Wärmetönung verbunden sind und sich der Wärmetönung der PBS überlagern

5.3.4. Thermogrammverlauf der Aminoacylierung

Das Auftreten eines endothermen Teils wird damit erklärt, daß mit dem Start der Reaktion in den ersten Sekunden bis Minuten vorrangig Aminoacylierung stattfindet, sich jedoch schnell ein Reaktionsgleichgewicht einstellt.

$$AS + t\text{-}RNS + ATP \xleftrightarrow[\text{synthetase}]{\text{Aminoacyl-}} \underbrace{AS\text{-}t\text{-}RNS}_{\text{Komplex}} + AMP + PP_i + Enzym$$

Diese Erklärung zusammen mit den Daten aus Tabelle 5 (S. 28) führte zu der Vermutung, daß die Aminoacylierung im Kalorimeter nachweisbar sein müßte.

Gibt man nun die Substanzen, die für die Aminoacylierung essentiell sind (EF,t-RNS,AS),zusammen unten in das Reaktionsgefäß und ATP, PeP, PeP-Kinase oben in einen Becher, so erhält man eine endotherm verlaufende Reaktion.

Abbildung 14 zeigt das Thermogramm einer Aminoacylierung.

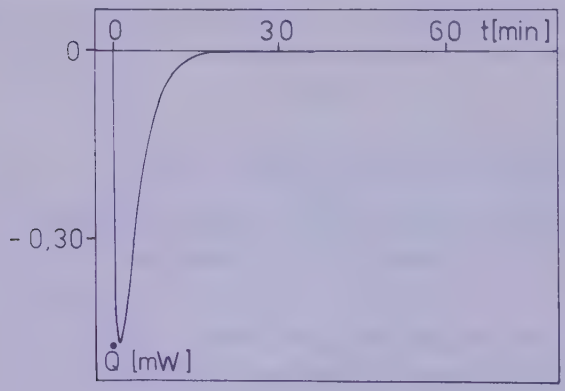


Abb. 14 Thermogramm der Aminoacylierung (System II)
Ansatz: Wie Vollsystem, jedoch ohne Ribosomen, ohne Poly-U, MIX ohne GTP.

Man sieht, daß dieser Prozess trotz Spaltung von ATP Wärme verbraucht. Gestützt wird dieses Ergebnis durch die Tatsache, daß bei veränderter räumlicher Anordnung der Substanzen während der Temperierungszeit bei einem normalen PBS-Prozess kein endothermer Peak mehr auftritt. D.h. gibt man schon zu Beginn den MIX zu den AS der t-RNS, Poly-U und zu EF, so hat sich das Gleichgewicht der Aminoacylierung schon eingestellt, bevor die PBS mit der Zugabe der Ribosomen gestartet wird. In Abbildung 15 sind zwei solche Systeme miteinander verglichen.

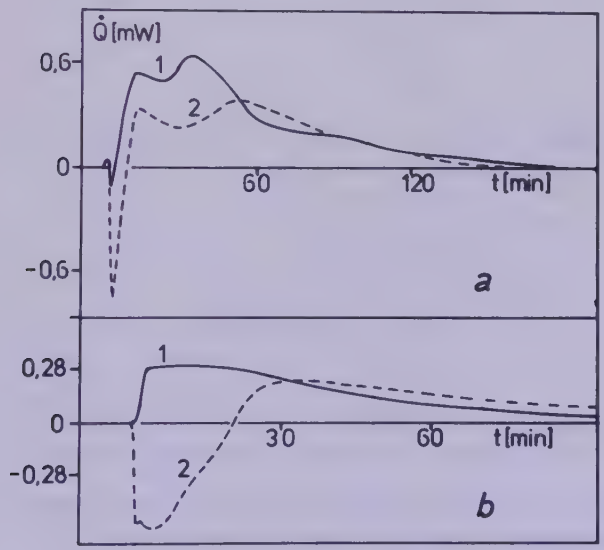


Abb. 15 Einfluß der räumlichen Anordnung der PBS-Fraktionen während der Temperierungszeit auf den Thermogrammverlauf

a: im Hefevollsystem (System II)
b: im Bakterienvollsystem

5.3.5. Abhängigkeit des Thermogrammverlaufs von der Menge und dem Reinigungsgrad der Ribosomen

In allen Systemen wurde eine Abhängigkeit der insgesamt abgegebenen Wärme von der Menge MIX, die dem System zugeführt wurde, festgestellt (s. auch Abb. 11). In den Systemen II-IV konnte jedoch nur bedingt eine lineare Korrelation festgestellt werden.

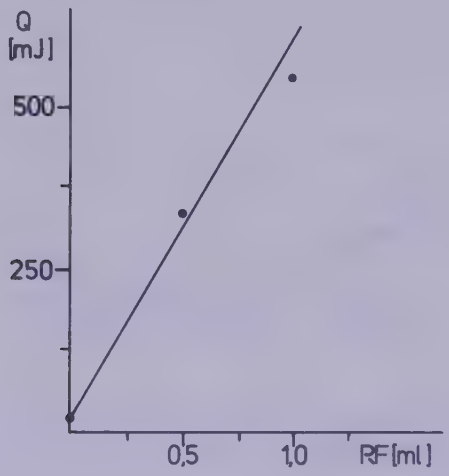


Abb. 16 Abhängigkeit der Wärmeabgabe von der Ribosomenmenge (System II)
Ansatz: 0,5 ml MIX, 0, 0,5; 1,0 ml RF OD_{260}= 400

Eine Mischung von Ribosomen und MIX ergab stets eine exotherme Reaktion (s. Schema 5, Abb. 17). Hier zeigte sich, daß
- von Isolierung zu Isolierung
- je nach Reinigungsgrad der Ribosomen

die Wärmeproduktion verschieden groß war.

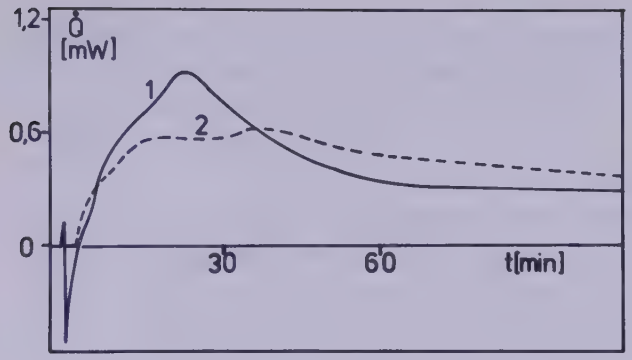


Abb. 17 Thermogrammverlauf eines Gemischs von Ribosomen und MIX

1: Ribosomen isoliert nach Schema 1,
d.h. mit TMA-B Puffer (pH 7,5) gewaschen
2: Ribosomen isoliert nach Schema 1,
jedoch über ein 2 M Sucrosekissen zentrifugiert

Wie man aus Abbildung 16 (S.38) deutlich sieht, ist die insgesamt abgegebene Wärme vom Grad der Reinigung der Ribosomen abhängig.

Das läßt folgende Möglichkeiten zu:

1. Die festgestellte Wärmeabgabe wird von lose am Ribosom hängenden Enzymen bewirkt, die bei geeigneter Reinigung abgewaschen werden.
2. Die Wärmetönung wird durch die Aktivität fest an das Ribosom gebundener Enzyme bewirkt, deren Aktivität durch die Reinigung verloren geht.
3. Die Wärmetönung wird durch am Ribosom laufende endogene Peptidsynthese verursacht.

Folgende Erklärung der unter Punkt 5.3.1. bis 5.3.5. beschriebenen Effekte wäre möglich:
Die aufgezeichneten Thermogramme sind durch Prozesse verursacht, die nicht zur Peptidsynthese gehören, sondern durch solche, die parallel zur PBS am Ribosom ablaufen.

Hinweise dafür sind:

- Verstärke Reinigung der Zellkomponenten führt zur Abnahme der Wärmeproduktion (Abb. 9, 12, S.30,34).
- Die Rate der Peptidsynthese hat kaum Einfluß auf den Verlauf der Thermogramme (Abb. 12, 13, S. 35).
- Die Ribosomen zusammen mit MIX produzieren Wärme ohne für die PBS essentielle Faktoren wie AS, t-RNS und Poly-U (Schema 5, S.28).
- Der Grad der Wärmeproduktion durch Ribosomen hängt vom Grad ihrer Reinigung ab (Abb. 17, S. 39).
- Weglassen essentieller Faktoren beeinflußt die Thermogramme nicht (Abb. 13, S. 35).

Die oben genannte Hypothese steht in klarem Widerspruch zur Annahme von Uttech et al. (18) und Lamprecht et al. (19). Sie hatten auf Grund der Komponentenabhängigkeit der Wärmeproduktion (s. auch Abb. 10, S. 31) berechtigterweise angenommen, daß die erhaltenen Thermogramme mit PBS zu korrelieren sind. Um nachweisen zu können, ob die hier aufgestellte Hypothese oder ob die von Uttech vertretene richtig ist, wurde versucht herauszufinden,

wie groß der Einfluß der Peptidsynthese auf die Thermogramme tatsächlich ist.

Der Einfluß der Peptidsynthese auf die Thermogramme wurde durch gezielte Inhibition der Peptidsynthese getestet.
Es wurde davon ausgegangen, daß eine gezielte Hemmung verschiedener PBS-Schritte zu einer charakteristischen Veränderung der Thermogramme führen müßte.

6. Inhibition der Proteinbiosynthese

Da die Vermutung bestand, daß die erhaltenen Thermogramme nicht nur auf Proteinbiosynthese zurückzuführen sind, wurde gezielt untersucht, inwieweit der Einbau von ^{14}C-Phe durch Antibiotika gehemmt wird und welche Änderung der Thermogramme durch eine Inhibition der Peptidsynthese verursacht wird.

Um die Wirkungsweise von Antibiotika zu erklären, muß auf die Funktion des Ribosoms eingegangen werden*. Man kann das Ribosom als den Kristallisationspunkt der PBS bezeichnen. An ihm lagern sich die Komplexe, die im Zellplasma gebildet werden, (Aminoacyl-t-RNS) sowie die m-RNS und die AS an. Während der Schritte der PBS (Initiation, Elongation und Termination) kommen verschiedene enzymatische Faktoren hinzu, ohne die die PBS nicht ablaufen könnte. So kommt es, daß Inhibitoren, die Prozesse in der Überstandsfraktion hemmen, ebenso inhibieren wie solche, die direkt am Ribosom angreifen (36,37,38,39,40).

Schema 6 zeigt eine Aufstellung der verwendeten Inhibitoren sowie Angaben über ihren Wirkungsort.

---

*Zusammenfassende Literatur zur Proteinbiosynthese:
M. Nomura et al. (41)
M. Zasloff et al. (42)
P.D. Leader et al (43)
J. Lucas-Lenard und F. Lipmann (6)

Schema 6

Antibiotikum	Initiation	Codonerkennung	Transpeptidierung	Translocation	Ort der Wirkung
Fussidinsäure (77)	Aminoacyl-t-RNS-bindung in Abwesenheit von EFG, wenn Konz $\geq$ 3mM			Hemmt GTPase-Aktivität (katalysiert von EFG bzw. T_2) wenn Konz $\leq$ 3mM	70 S, 80 S
Chloramphenicol		Catalytisches Zentrum	C-C-A (A-A) bindung	Austausch d. ribosomalen Untereinheiten Translocation d. m-RNase	50 S
Cycloheximid	t-RNS-f-met-bindung			m-RNS Ribosomenbewegung	60 S
Puromycin			C-C-A (A-A) bindung	Austausch d. ribosomalen Untereinheiten	50 S 60 S
RNase					degradiert RNS, hemmt Polysomenbildung

6.1. Methode der Inhibition

6.1.1. - Biochemischer Ansatz, d.h. Synthese von ^{14}C-Polyphenylalanin

Es wurde der selbe Inkubationsansatz verwendet, wie für die Poly-U-abhängige Polyphe-Synthese. Der Versuchsansatz wurde jedoch ungefähr 1 min bei 0 C mit 50 µl Inhibitorlösung inkubiert*, bevor die Reaktion durch Zugabe von ^{14}C-Phe und MIX gestartet wurde.

6.1.2. - Mikrokalorimetrischer Ansatz

Im mikrokalorimetrischen Ansatz wurde zu den Fraktionen im Hauptgefäß die Inhibitorlösung gegeben. MIX und RF wurden getrennt in den Bechern aufbewahrt. Mit Durchstoßen der Becherböden wurde die Reaktion gestartet.

6.2. Wirkungsort und -mechanismus der Inhibitoren

In Schema 6 sind Syntheseschritte für Peptide, sowie der Wirkungsort der verwendeten Inhibitoren dargestellt. Es wurden Inhibitoren für die Initiation (Cycloheximid) und Transpeptidierung (Puromycin, Chloramphenicol) und zur Degradation der gesamten RNS enthaldenden Bausteine (RNase) eingesetzt.

---

* Konzentration der eingesetzten Hemmstoffe:

Cycloheximid	$1 \cdot 10^{-3}$ M	Chloramphenicol	$1{,}6 \cdot 10^{-3}$ M
Puromycin	$1 \cdot 10^{-3}$ M	RNase	$5 \cdot 10^{-5}$ M

6.2.1. Cycloheximid

Der erste Schritt der PBS am Ribosom ist die Initiation. Ein Initiationsfaktor M3 bei Eukaryonten (Bakterien IF3)* verbindet sich mit einer Initiationsnucleotidsequenz der m-RNS. Dieser Komplex wird dann an die kleine Untereinheit des Ribosoms (S40 bzw. S30) gebunden (41,42,43). Das Initiatorcodon AUG oder GUG der m-RNS kommt somit in die geeignete Stelle, um die Aminoacyl-t-RNS binden zu können. Hierzu sind die Faktoren M1, M2 (IF1, IF2 bei Bakterien) notwendig, ebenso wie GTP als sterischer Faktor. An diesem Komplex wird die große Untereinheit angelagert.
Vor diesem Zustand ist vermutlich ein Zustand möglich, indem die t-RNS-f met erst in der acceptor (a)-side ist (nicht-Puromycin-sensitive Seite). Die Überführung von der a-side in die Puromycin-sensitiv (p)-side erfordert u.U. die Hydrolyse von GTP (44,45,46). Die Initiation der Poly-U abhängigen Poly-Phe-Synthese wird durch Cycloheximid gehemmt. Orbig (47) stellte fest, daß bei Reticulocyten-Ribosomen Cycloheximid die Komplexbildung mit f-met-t-RNS verhindert. Cycloheximid wirkt dabei auf 80S Ribosomen, d.h. die Inhibition ist nicht ohne weiteres auf andere Systeme übertragbar, bei denen Ribosomenuntereinheiten verwendet werden.

6.2.2. Puromycin

Puromycin hemmt die Transpeptidierung. Auf die Initiation folgt die Transpeptidierung. Die f-met-t-RNS wird in der a-side gebunden (48) und rückt dann mit der m-RNS im Ribosom zur p-side weiter. In die a-side rückt eine neue Aminoacyl-t-RNS ein. Die Bindung von

---

*IF3, M3 werden für synthetische Polynucleotide wie z.B. Poly-Phe nicht benötigt.

Aminoacyl-t-RNS wird bei Eukaryonten durch das Enzym Transferase T oder T1 katalysiert. Es ist vergleichbar mit dem Enzym EFT (Elongationsfaktor T) von E.coli. Der Wirkungsmechanismus ist ebenfalls vergleichbar.

$$EFT_u - GDP \xrightarrow{EFTs} EFT_u - GTP + GDP$$

$$EFT_u - GTP + aat\text{-}RNS \longrightarrow aat\text{-}RNS - EFT_u - GTP$$

$$Ribosom - m\text{-}RNS + aat\text{-}RNS - EFT_u - GTP \longrightarrow$$

$$\longrightarrow aat\text{-}RNS - Ribosom - m\text{-}RNS + EFT_u\ GDP + P_i$$

Bei E.coli wird die Elongation durch zwei Faktoren katalysiert: Elongationsfaktor EFT_u und EFT_s, die unter bestimmten Bedingungen als 1 Enzym EFT vorliegen. Bei Eukaryonten ist die Transferase aus Rattenleberreticulocyten isoliert worden (49,50).
In frühen Arbeiten von Spyrides und Lipmann (1964) (51) sowie von Arlinghaus et al. (52) wurde darauf geschlossen, daß Aminoacyl-t-RNS und Ribosomen eine Bindung eingehen können, da Poly-U und Ribosom zusammen in der Lage waren, Phe zu binden. Puromycin besitzt eine schwache Affinität zur Peptidyltransferase (53). Dadurch wird die natürliche Peptidkette vom Ribosom befreit. Pro Molekül gebundenem Puromycin wird 1 Peptidkette frei.
S. Petska konnte zeigen (54), daß Puromycin verhindert, daß das Aminoacylende der Aminoacyl-t-RNS an das Ribosom gebunden wird. D.h. Puromycin hemmt den Schritt der Bindung der aa-t-RNS an das Ribosom, der durch die Transferase katalysiert wird. Deshalb wird Puromycin oft als Inhibitor der Transferase bezeichnet. Das ist jedoch nicht korrekt.

6.2.3. Chloramphenicol

Ein wirklicher Inhibitor der Peptidyltransferase ist Chloramphenicol. Es hemmt die Anlagerung der aa-t-RNS dadurch, daß die Transferase inhibiert wird. Chloramphenicol greift an der a-side durch Interaktion mit dem Substrat in die Bindung der aa-t-RNS an das Ribosom ein (55,56,57). Es hemmt jedoch nur die PBS bei Prokaryonten oder prokaryontische Systeme aus Eukaryonten wie die mitochondriale PBS.

6.2.4. Ribonuclease (RNase)

Genaueres über den biochemischen Wirkungsmechanismus der RNase ist im Kapitel über Enzymreaktionen (S. 51 ff) ausgeführt. Die RNase wirkt unspezifisch auf m-RNS, t-RNS und ribosomale Nucleinsäure. Je nach der Spezifität ihrer hydrolytischen Wirkung greift sie gezielte Nucleotide an. Dadurch mindert sie die insgesamt zur Verfügung stehenden Substanzen.

6.3. Versuche der Interpretation der erhaltenen Thermogramme

Die hier verwendeten Inhibitoren wirken auf drei verschiedene Arten. Als Voraussetzung für die Interpretation nehmen wir an: Der endotherme Peak der Thermogramme ist mit der Aminoacylierung korreliert (s. Abschn. 5.3.4.). Den exothermen Teil der Thermogramme führen wir auf Vorgänge am Ribosom zurück. Die Thermogramme der PBS entstehen durch Überlagerung dieser beiden Prozesse.

6.3.1. RNase

Die PBS wird insgesamt vermindert. Es wird nicht spezifisch ein Syntheseschritt gehemmt. D.h. es ist dasselbe Thermogrammuster wie für das Vollsystem zu erwarten*, jedoch mit leicht vermindertem exothermen und endothermen Peak.

6.3.2. Puromycin

Die PBS läuft bis zur GTP-Spaltung am Ribosom ungehindert und wird dann geblockt. Die durch die GTP-Spaltung freigesetzte Energie kann nicht mehr zur Translokation verwendet werden. Die Aminoacylierung verläuft ungestört. Die freiwerdende Energie der GTP-Hydrolyse verursacht daher eine schwächere Ausbildung des endothermen Peaks als im Vollsystem.

6.3.3. Cycloheximid

Es kommt erst gar nicht zur GTP-Hydrolyse. Cycloheximid inhibiert den Prozeß der Translokation schon beim ersten Schritt der f-met-t-RNS-Bindung in der a-side als Inhibitor der Translokase. Da hierbei die Aminoacylierung und die Anlagerung der aa-t-RNS in vollem Umfang ablaufen können, wird der endotherme Teil etwa gleich groß wie beim Vollsystem.

6.3.4. Chloramphenicol

Chloramphenicol wirkt ähnlich wie Puromycin, jedoch nur auf prokaryontische Systeme. Es wäre also zu erwarten, daß sich das Thermogramm nicht von dem eines ungehemmten Vollsystems unterscheidet**.

---

* Mit Vollsystem wird der PBS-Ansatz bezeichnet, bei dem weder Fraktionen weggelassen noch Inhibitoren zugefügt wurden.

** In ersten Versuchen von Uttech zur Inhibition der PBS durch Antibiotika zeigte sich, daß die Inhibition durch Chloramphenicol keinen Einfluß auf den Thermogrammverlauf in System I hat.

In Schema 7 ist die Inhibition der PBS durch Antibiotika eingetragen, bezogen auf den Volleinbau des Systems ohne Antibiotika. Man kann aus der Tabelle entnehmen, daß die Inhibitionswerte etwa den in der Literatur angegebenen entsprechen. Ferner sind die Werte für die Wärmetönung, mit der die Reaktion verbunden ist, angegeben. Betrachtet man Schema 7, so treten etwa die unter 6.3.1. bis 4 erwarteten Thermogrammänderungen ein. Eine Deutung dieser Ergebnisse für sich allein genommen ist außerordentlich schwierig.

Eindeutig ablesbar ist:

- die erwartete Thermogrammform wird etwa erhalten (siehe 1 bis 3).
- bei allen verwendeten Antibiotika ist der exotherme Teil des Thermogramms vernachlässigbar gering.
- die grundsätzliche Thermogrammform wie beim Vollsystem bleibt bestehen.

Die Tatsache, daß der exotherme Teil der Reaktion bei allen Thermogrammen ohne Antibiotika auftritt und bei Zugabe von Antibiotika vernachlässigbar klein wird, weist darauf hin, daß dieser Thermogrammteil etwas mit PBS zu tun hat. Es wurde jedoch nicht überprüft, wie weit die Zugabe von Antibiotika die Aktivität von Enzymen am Ribosom (Phosphatasen oder RNasen) hemmt. Die Wärmetönung der Bindung des Inhibitors an das Ribosom ist vernachlässigbar und kleiner als $40 \cdot 10^{-3}$ J.

Schema 7

Systeme	% Einbau	Literaturwerte (% Einbau)			+ Q ($J\ 10^{-3}$)**	- Q ($J\ 10^{-3}$)***
Vollsystem	100				404 ± 84	361 ± 84
Chloramphenicol*	57 ± 8	1 mM	100%	(58)	403 ± 104	0 ± 0
Cycloheximid	22 ± 8	1 mM	15 - 30%	(58)		
		0,01 M	14%	(59)	322 ± 84	27 ± 29
Puromycin	29 ± 10	0,1 mM	0%	(60)		
		0,1 mM	38%	(59)	94 ± 42	21 ± 20
RNase	18 ± 2				249 ± 84	38 ± 42
Fussidinsäure	17 ± 10	1 mM	7%	(60)	Wie Vollsystem, kein Unterschied	

* Die Inhibitionswerte mit Cycloheximid weisen darauf hin, daß die verwendeten Systeme stark mit mitochondrialen Anteilen versetzt sind.

** Endotherme Reaktion, d.h. Wärmeaufnahme aus der Umgebung

*** Exotherme Reaktion, d.h. Wärmeabgabe an die Umgebung

7. Enzymreaktionen am Ribosom

7.1. Exotherm verlaufende Reaktionen am Ribosom

Wie schon aus Schema 5 zu entnehmen ist, gibt ein Gemisch von Ribosomen und MIX Wärme ab. In Abbildung 18 sind Thermogramme von Versuchen aufgetragen, bei denen unterschiedlich gereinigte Ribosomen mit MIX inkubiert wurden. Thermogramm 1 und 2 stellen die Wärmeabgabe von Heferibosomen dar, die nach der Methode von Schulz-Harder (Schema 2) isoliert wurden. Bei der Ribosomenfraktion RFS ist genau nach diesem Isolierungsverfahren vorgegangen worden. D.h. zur Ablösung von Membranstücken wurde zusätzlich zur hohen KCl-Konzentration mit 2% Brij 58 behandelt und dann durch Zentrifugation über einen Sucrosegradienten gereinigt. Bei der Fraktion RFM wurde der Ribosomenniederschlag 20 min bei 0 C mit 0,6 M Ammoniumchlorid inkubiert und dann die Ribosomen bei ungefähr 300 000 g (60 000 rpm) in der Beckmann-Ultra-Zentrifuge niedergeschlagen. Thermogramm 3 und 4 stellen die Wärmeproduktion von nach Uttech isolierten Ribosomen dar. Dabei wurde die RFT genau nach Schema 1 isoliert, während die RFS zusätzlich über ein 2 M Sucrosekissen 15 Stunden bei 30 000 rpm im Festwinkelrotor abzentrifugiert wurde*.

---

*Bei RFS wurden eventuell am Ribosom haftende Zellmembranreste durch diese Reinigung abgelöst, bzw. Ribosomen mit Membranresten werden im Sucrosekissen zurückgehalten.

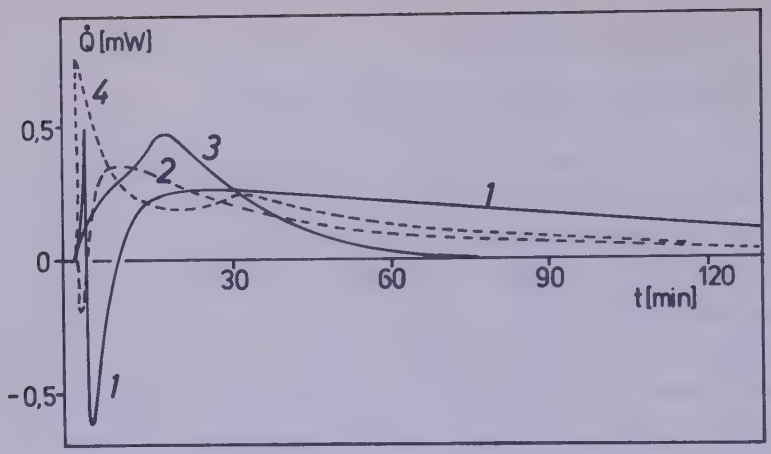


Abb. 18 Einfluß der Isolierungsmethode der Ribosomen auf den Thermogrammverlauf eines Gemischs von RF und MIX

1: RFS gereinigt nach Schema 2
2: RFM gereinigt nach Schema 2, zusätzlich 20 min bei 0 C mit 0,6 M NH_4Cl behandelt und dann nach Schema 1 abzentrifugiert
3: RFT Isolierung nach Schema 1
4: RFS Isolierung nach Schema 1, jedoch zusätzlich Uber ein 2 M Sucrosekissen gereinigt

Da bei Bakterien das endoplasmatische Retikulum (ER) fehlt, ist anzunehmen, daß an diesen Ribosomen keine enzymatischen Prozesse ablaufen, wie sie durch Verunreinigung mit ER-Resten bei Heferibosomen erwartet werden können*. Die Unterschiede der einzelnen Thermogramme sind mit dem augenblicklichen Wissensstand und den vorliegenden Ergebnissen nicht interpretierbar. An einem so komplexen Gebilde, wie

---

*Es ist also nicht zulässig, die verschiedenen Thermogrammverläufe dahingehend zu interpretieren, daß bei RFM noch Prozesse ablaufen, die in den am Ribosom hängenden Membranresten stattfinden, während sie bei mit Brij 58 behandelten Ribosomen nicht stattfinden.

es ein Ribosom darstellt (61), von dem man nicht einmal genau den Reinheitsgrad weiß, können sehr viele Prozesse ablaufen. In der Diskussion wird noch genauer ausgeführt, daß es sich bei den hier beschriebenen Effekten nicht um Änderungen der ribosomalen Struktur handelt, sondern vor allem um enzymatische Prozesse. Der dem Ribosom als Energiequelle angebotene MIX ist ebenfalls sehr komplex*, so daß man nicht weiß, von welcher der Komponenten diese Reaktionen abhängig sind. Dies war ein Grund, weshalb Untersuchungen zur Hydrolyse von ATP und GTP durch Ribosomen durchgeführt wurden (s.S. 64ff). Zum anderen hatte sich die Vermutung, mit Hilfe gezielter Inhibition der PBS die Thermogramme und die PBS-Prozesse aufschlüsseln zu können, nicht bestätigt (s.S. 49,50 und Diskussion). Es war nun notwendig geworden, einfache chemische Prozesse, die im Zusammenhang mit der PBS am Ribosom auftraten, genauer zu untersuchen. Nach den biochemischen Untersuchungen von Schulz-Harder (21) und Lother (35) waren dies vor allem die Hydrolyse von RNS durch RNase und die Spaltung von ATP und GTP durch Phosphatasen.

7.2. Ribonucleasen (RNasen)-Aktivität am Ribosom

Der enzymatische Abbau von RNS im Ribosom sowie von RNS, die zeitweise am Ribosom haftet, wie t-RNS oder m-RNS, ist seit Anfang der 60iger Jahre eindeutig nachgewiesen. Von Santer (62) und Pinder und Gratzer (63) wurde festgestellt, daß aus dem Ribosom isolierte RNS als freie RNS angreifbar ist. Auch ist nicht alle RNS im Ribosom gleich stark angreifbar. Die Möglichkeit des Abbaus der RNS hängt vom Zustand der Ribosomen ab, d.h. davon, wieweit das Ribosom entfaltet ist, wobei nach Shiguera und Chargaff (64) sowie nach Niegel Godson et al. (65) Mg^{2+}-Ionen eine kritische Rolle spielen. Nach Cotter et al. (66) liegt die RNS an der Oberfläche des Ribosoms,

---

*MIX besteht aus ATP, GTP, PeP und PeP-kinase

so daß der größte Teil für enzymatische Prozesse erreichbar ist. Nach Cox (67) findet der Abbau von RNS vor allem an der Oberfläche des Ribosoms statt, da die RNase nicht in das Ribosom eindringen kann. Die RNS im Inneren kann also nur angegriffen werden, wenn sich die ribosomale Konfiguration ändert.

Die Vorstellungen, wonach sich die RNase nicht am oder im Ribosom befindet, können heute nicht mehr aufrecht erhalten werden. Ceri und Maeba (68) haben bei E.coli gefunden, daß eine Proteinfraktion der Ribosomen, die ein 50 S-Protein enthält, RNase-Aktivität aufweist. Sie konnten RNase-Aktivität sowohl im intakten Ribosom als auch in der gesamten ribosomalen Fraktion (50S und 23S-RNS) nachweisen. Die von ihnen gefundene Aktivität der Autodegradation war jedoch nicht im säurelöslichen Überstand sondern nur in der Gelelektrophorese nachweisbar*. Weitere Hinweise auf RNasen-Aktivität, die an das Ribosom gebunden ist, geben Menninger et al. (70). In der Arbeit wurde die Hydrolyseaktivität von Rattenleberribosomen nachgewiesen, das Enzym jedoch nicht gereinigt. Beim Waschen der Ribosomen mit 1,0 M Ammoniumchlorid, 0,1 mM Magnesiumchlorid in isotonischem Milieu wurde die meiste Aktivität abgetrennt. Auf Grund der Tatsache, daß die gefundene Hydrolase nicht spezifisch N-acetyl-aminoacyl-t-RNS abbaut, haben Menninger et al. diskutiert, inwieweit diese Hydrolase regulierend in den Stoffwechsel eingreift.

Für das allgemeine Vorkommen solcher Enzymaktivitäten spricht, daß RNasen-Aktivität nicht nur in Bakterien und Leberzellen nachgewiesen worden ist. Kössel und Bhandary (71) sowie Jost und Bock (72) beschreiben ein Enzym aus Hefe, das Hydrolaseaktivität gegenüber RNS aufweist und ebenso wie das von Menninger et al. be-

---

* Photometrisch wurde die RNasen-Aktivität in der vorliegenden Arbeit immer im säurelöslichen Überstand nach der Methode von T.Uchida und F.Egami (69) nachgewiesen.

schriebene f-met-t RNS aus E.coli angreift. Dies wurde von Menninger als eindeutiger Hinweis auf eine regulatorische Funktion dieser Enzymgruppen gewertet. Einen weiteren Hinweis auf eine regulatorische Funktion gibt die Arbeit von Chet et al. (73). Sie haben beim Schleimpilz Physarum polycephalum 12 Isoenzyme von RNase gefunden, deren Aktivität stark von der Wachstumsphase abhängt. Bringt man den Organismus durch Mannitolbehandlung zum sporulieren, so wird damit auch eine Steigerung der RNasen-Aktivität induziert. Diese Steigerung ist hemmbar durch Zugabe von Cycloheximid zum Wachstumsmedium, nicht jedoch durch Zugabe von Actinomycin D. Dies kann als Hinweis dafür gelten, daß die RNasen-Aktivität mit der Proteinsynthese, jedoch nicht mit der RNS-synthese zusammenhängt.

Aus der in der Literatur beschriebenen Aktivität der RNase sowie aus der Lokalisierung der RNasen-Aktivität ist zu folgern, daß der Prozess des RNS-Abbaues parallel zur PBS stattfindet. Es ist zu vermuten, daß die Aktivität nicht nur bei der PBS in vivo, sondern auch in vitro auftritt.

Wie auf S. 53 gezeigt wurde, ist die Aktivität von hydrolytischen Enzymen (RNase) zum Teil auch an das Ribosom gebunden. Es war also zu erwarten, daß in der aus Hefe isolierten Ribosomenfraktion solche Enzyme ebenfalls vorhanden sind. Die in Abbildung 18 (s.S. 52) gezeigten Ergebnisse können als Hinweis gewertet werden. Im folgenden Kapitel wird der Versuch dargestellt, die RNasen-Aktivität in der Ribosomenfraktion sowohl photometrisch als auch mikrokalorimetrisch zu bestimmen.

7.2.1. Photometrische Bestimmung der RNasen-Aktivität

In Abbildung 19 ist die hydrolytische Wirkung von RF auf RNS sowie die Autodegradation von RF dargestellt und die hydrolytische Wirkung von RNase auf RNS und RF.

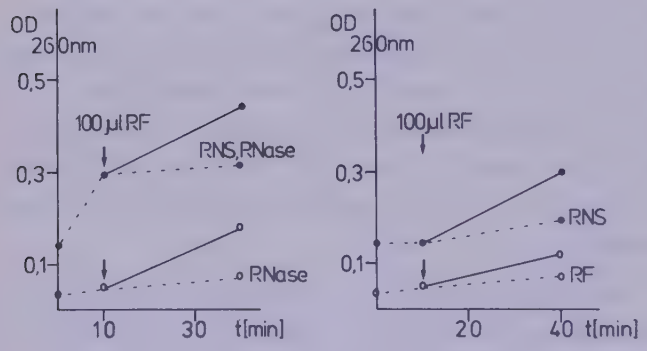


Abb. 19 Hydrolytische Wirkung von RNase und RF auf RNS

Reaktionsansatz: 250 µl RNS (30mg/ml), 100 µl RNase (0,5mg/ml), 100 µl RF OD_{260}= 90 (isoliert n.Sch.1 System II), 30 µl TRIS-HCl, EDTA-Puffer pH 7,5, Inkubationstemperatur 30 C.

In Abbildung 20 ist die RNasen-Aktivität verschieden gereinigter Ribosomenfraktionen aus Hefe dargestellt. Es zeigt sich, daß in System I die Aktivität der in Puffer (TMA-B) und in 0,6 - 1 M Ammoniumchlorid bei 5 mM Mg^{2+} gewaschenen Ribosomen etwa gleich groß ist. Nach Menninger et al. (70) müßte jedoch ein großer Teil der Aktivität der Ribosomenfraktion durch Waschen mit 1 M Ammoniumchlorid verloren gehen. Bei der Isolierungsmethode nach Schema 2 ergibt sich, daß die Aktivität der nicht mit Brij 58 sondern nur mit Puffer (R1) gewaschenen Ribosomen weit höher liegt, als bei den Ribosomen aus System I. Die nach Schema 2 isolierten Ribosomen, die mit 0,6 M Ammoniumchlorid gewaschen wurden, und

die, die mit 1% Brij 58 behandelt wurden und über einen Sucrose-stufengradienten gegeben wurden, liegen in ihrer Aktivität erheblich unter den nur in Puffer (R1 und TMA-B) gewaschenen Ribosomen. Die Vermutung, daß bei der Behandlung der Ribosomen mit 200 mM Kaliumchlorid (Puffer R1) die Ribosomen leicht ihre Form verändern, könnte dafür eine Erklärung sein. Sie würde zumindest in das Modell der RNasen-Aktivität (s.S. 53 ff) passen.

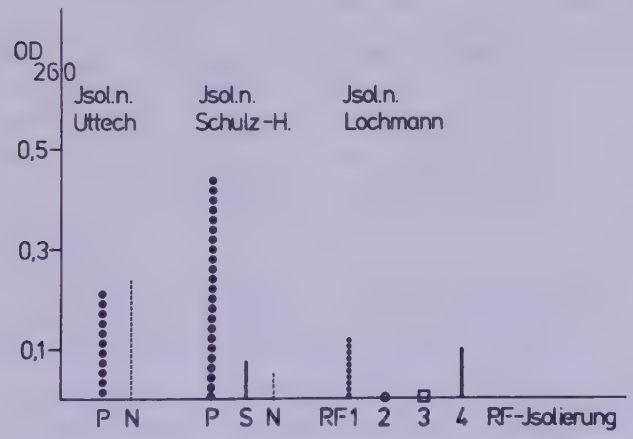


Abb. 20 Vergleich der RNS-Hydrolyseaktivität verschieden isolierter Ribosomen

Ansatz: 250 µl RNS (30mg/ml), 100 µl Ribosomenfraktion (OD_{260}= 90), 30 µl TRIS-HCl, EDTA-Puffer pH 7,5
P: Ribosomen isoliert nach Schema 1,
N: wie P, jedoch zusätzlich 20 min mit 0,6 M NH_4Cl bei 0 C im Eisbad behandelt, dann 60 min bei 300 000 g niedergeschlagen, Pellet in TMA-B Puffer gelöst.
RF1 bis RF4: Ribosomen isoliert nach Lochmann *.
RF1,RF4: an grobe Membranteile gebundene Ribosomen,
RF2: freie und an kleine Membranteile gebundene Ribosomen,
RF3: freie Ribosomen

---

*E.R. Lochmann unveröffentlicht

Da feststeht, daß RNasen-Aktivität an den Ribosomen zu finden ist, und da aus den Abbildungen 16, 17 zu entnehmen ist, daß Ribosomen zusammen mit MIX exotherm reagieren, wurde weiterhin untersucht, ob die Aktivität von RNasen am Ribosom durch MIX induzierbar ist. Bei den photometrischen Untersuchungen hierzu wurde festgestellt, daß MIX diese Enzymaktivität nicht stimuliert. In Schema 8 sind verschiedene Kombinationen von RNS, RNase, RF und MIX mit den dadurch erzielten optischen Dichten aufgezeigt.

	RNS	RNase	RF	OD_{260} (1:10 verd.)
RNS	+			0,0
RNase	+			0,16
RF	+	+		0,20
MIX	+	+	+	0,20
RNase		+		0,0
RF		+		0,05
MIX		+	+	0,05
RF			+	0,0
MIX			+	0,0

Schema 8: Hydrolyse-Aktivität verschiedener Kombinationen von RNS, RNase, RF und MIX.

Ansatz: 250 µl RNS (30mg/ml), 100 µl RNase (1,5mg/ml), 100 µl MIX, 300 µl TRIS-HCl, EDTA-Puffer pH 7,5
Inkubationszeit 30 min, Inkub.temperatur 30 C.
+: zeigt die Kombinationen an.

Dieses Ergebnis kann jedoch nur unter Vorbehalt dargestellt werden, da nach Ceri und Maeba (68) die Autodegradation von Ribosomen nicht mit der hier verwendeten Methode (d.h. Nachweis von anorganischem Phosphat im säurelöslichen Überstand) erfasst werden kann. Bei einigen Versuchen, bei denen Ribosomen künstlich durch Zugabe von käuflicher RNase gespalten wurden, zeigte sich, daß die Spalt-

produkte im photometrischen Test nachweisbar sind (Schema 8). Nachdem nachgewiesen war, daß RNasen-Aktivität in der Ribosomenfraktion vorhanden ist, war es von Interesse, festzustellen, ob die Wärmetönung dieser Reaktion groß genug ist, um die Thermogramme der PBS durch Überlagerung zu beeinflussen.

7.2.2. Nachweis der RNasen-Aktivität von Ribosomenfraktionen im Mikrokalorimeter

Bei der Auswertung von mikrokalorimetrischen Experimenten ist folgendes zu beachten:

- Bei komplexen Systemen ist nicht auszuschließen, daß auch andere Prozesse, als die gewünschten ablaufen
- Die in Abschnitt 3.1.4. generell zur Mikrokalorimetrie genannten Wärmen treten immer auf.

Zum Nachweis der RNasen-Aktivität von Ribosomen im Mikrokalorimeter wurde parallel zur Wärmeflußbestimmung der Umsatz an hydrolysierter RNS bestimmt. Ferner wurden mit käuflichen Substanzen Vergleichsversuche durchgeführt. In Abbildung 21 ist der Verlauf der Thermogramme der RNS-Hydrolyse in Abhängigkeit von der Ribosomenmenge wiedergegeben. Wir können entnehmen, daß mit steigender Ribosomenmenge und mit steigender RNS-Hydrolyse die insgesamt abgegebene Wärmemenge ebenfalls zunimmt.

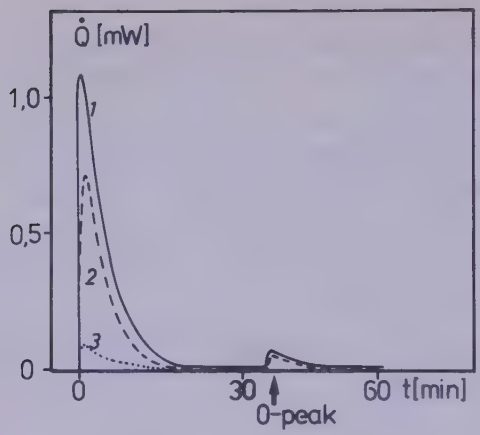


Abb. 21 Thermogrammverlauf der RNasen-Aktivität in Abhängigkeit von der RF-Menge

1: 2,5 ml RNS (12mg/ml), 1ml RF, RNS Umsatz in OD_{260}=4,5
2: 2,5 ml RNS (12mg/ml), 0,5 ml RF,RNS Umsatz in OD_{260}= 3,2
3: 2,5 ml RNS (12mg/ml), 0 ml RF,RNS Umsatz in OD_{260}= 0,7
Pro Ansatz 3,0 ml TRIS-HCl, EDTA-Puffer pH 7,5
Ribosomenkonzentration OD_{260}= 400

Aus Abbildung 21 ist zu entnehmen, daß die Ribosomen der limitierende Faktor für die RNS-Hydrolyse sind. Es wurde daher versucht, durch Zugabe von RNase den RNS-Abbau zu stimulieren, um eine vollständige Umsetzung zu erreichen.

Dazu wurde zu MIX einmal Ribosomen und RNase, zum anderen nur RNase allein zugeführt. Abbildung 22 zeigt den Verlauf der Thermogramme von TMA-B gewaschenen Ribosomen (isoliert nach Schema 1). Diese wurden wegen ihrer hohen RNase-Aktivität eingesetzt (s. Abb. 20). Die Tatsache, daß Hydrolyse von RNS durch RNase ohne Zugabe von RF endotherm verläuft, jedoch bei Zugabe von RF exotherm wird, ließ die Vermutung aufkommen, daß noch weitere Prozesse

am Ribosom nicht ausgeschlossen werden können. In Abschnitt 7.3. ist dargestellt, welche weiteren Enzymaktivitäten am Ribosom noch zu erwarten sind.

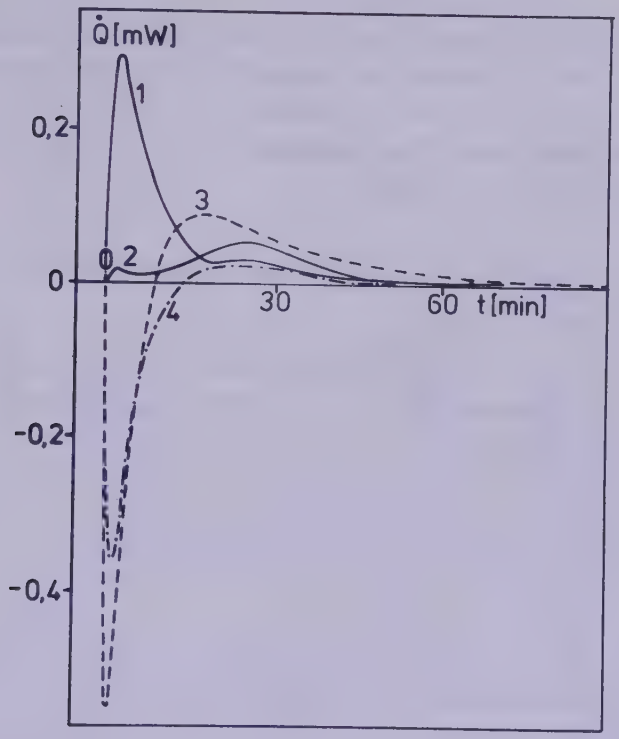


Abb. 22 Abhängigkeit des Thermogrammverlaufs der RNS-Hydrolyse von verschiedenen Kombinationen von RNase, RNS, RF und MIX

1: 0,5 ml RNase (1,5 mg/ml), 2,5 ml RNS (30 mg/ml) 0,5 ml RF OD_{260}= 400, 0,5 ml MIX, 1 ml TRIS-HCl, EDTA-Puffer pH 7,5 hydrolysierte RNS in Einheiten OD_{260}= 4,8

2: wie 1 jedoch ohne RNS, 3,5 ml TRIS-HCl, EDTA-Puffer hydrolysierte RNS in Einheiten -

3: wie 1 jedoch ohne RF und ohne MIX, 2 ml TRIS-HCl, EDTA-Puffer hydrolysierte Einheiten in OD_{260}= 3,0

4: wie 1 jedoch ohne RF, 1,5 ml TRIS-HCl, EDTA-Puffer hydrolysierte RNS Einheiten in OD_{260}= 3,4

7.2.3. Vergleichende Untersuchungen zur RNasen-Aktivität mit käuflichen Substanzen

Trotz der erheblichen Unterschiede in der Wärmetönung weist der RNS-Umsatz nur geringe Unterschiede auf. Um feststellen zu können, ob die umgesetzten Wärmen anderen Prozessen als der Hydrolyse von RNS durch RNase zuzuordnen sind, wurden Versuche mit käuflicher RNS und RNase gemacht. Es wurde im Mikrokalorimeter die Wärmetönung der Hydrolyse der RNS durch RNase in Abhängigkeit von der Enzym- und der Substratkonzentration bestimmt.

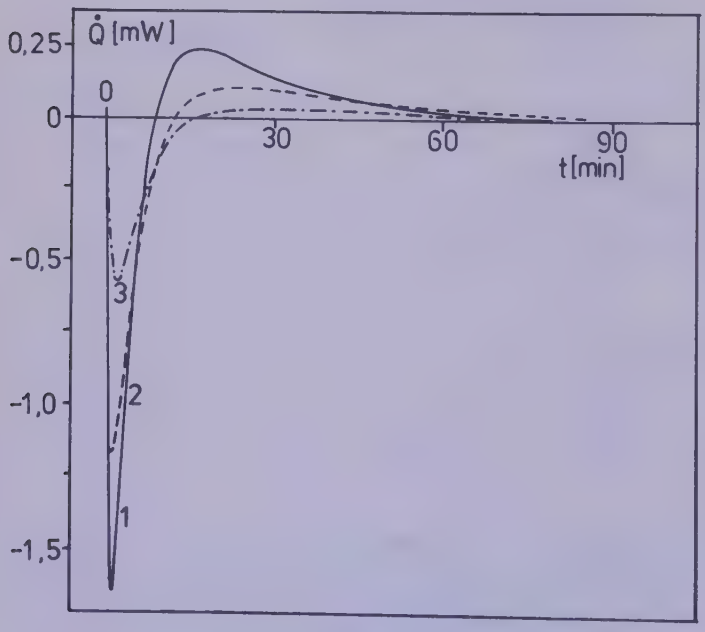


Abb. 23 Änderung des Thermogrammverlaufs in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bei konstanter Enzymkonzentration

1: 2,5 ml RNS (30 mg/ml), 0,5 ml RNase (1,5 mg/ml)
2: 2,5 ml RNS (15 mg/ml), 0,5 ml RNase (1,5 mg/ml)
3: 2,5 ml RNS (1,5 mg/ml), 0,5 ml RNase (1,5 mg/ml)
Pro Ansatz wurden 2 ml TRIS-HCl, EDTA-Puffer pH 7,5 zugegeben.

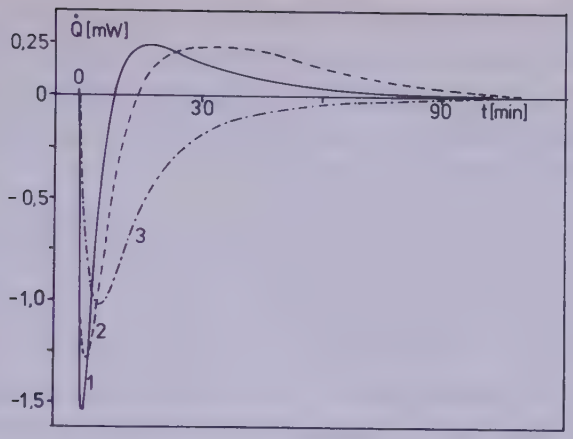


Abb. 24 Änderung des Thermogrammverlaufs in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bei konstanter Substratmenge

1: 1,0 ml RNase (1,5 mg/ml), 2,5 ml RNS (30 mg/ml)
1,5 ml TRIS-HCl, EDTA-Puffer pH 7,5
2: 1,0 ml RNase (0,15 mg/ml), 2,5 ml RNS (30 mg/ml)
1,5 ml TRIS-HCl, EDTA-Puffer pH 7,5
3: 1,0 ml RNase (0,015 mg/ml), 2,5 ml RNS (30 mg/ml)
1,5 ml TRIS-HCl, EDTA-Puffer pH 7,5

7.2.4. Interpretation der erhaltenen Thermogramme

Es ist festzustellen, daß ohne Ribosomen der exotherme Peak entfällt. Statt dessen erhält man einen Verlauf, wie er z.B. von Benzinger und Kitzinger (74) für Enzym-Substratreaktionen beschrieben wurde. Betrachtet man die Thermogramme der RNasen-Reaktion, so sieht man, daß mit sinkender Geschwindigkeit der Reaktion (sinkende Enzymkonzentration) der exotherme Anteil der Reaktion verschwindet. Zur Erklärung dieser Erscheinung wird die Hypothese aufgestellt, daß sich die Thermogramme von zwei Prozessen überlagern:

- Die Komplexbildung zwischen RNase und RNS
- Die Hydrolyse der RNS

Die Komplexbildung zwischen RNase und RNS verläuft sehr viel schneller als die Hydrolyse*. Jede Reaktion für sich genommen würde einen Verlauf mit steilem Anstieg und exponentiellem Abfall haben. Die Steilheit des Anstieges ebenso wie der Abfall hängt von der Verzögerung im Meß- und Anzeigesystem ab (75)**.

Mit Änderung der Enzym- oder der Substratkonzentration ändert sich auch der Verlauf der Kurven für die Komplexbildung bzw. die Hydrolyse. Nur eine mathematische Erfassung der beiden Kurven kann Aufschluß über die jeweiligen Anteile an der Gesamtreaktion geben.

Wie im Anhang I noch gezeigt wird, ist zwar meist feststellbar, aus wieviel Teilreaktionen ein Thermogramm mindestens zusammengesetzt ist. Es ist jedoch nicht feststellbar, wie groß der Wärmeumsatz der einzelnen Reaktionen ist. D.h. eine eindeutige Aussage über die mit der RNS-Hydrolyse verbundenen Wärmetönung ist nicht möglich.

7.3. Adenosintriphosphatase-(ATPase) und Guanosintriphosphatase-(GTPase) Aktivität am Ribosom

Nach Spirin (12), Keller und Zamecnick (76) benötigt der Prozess der PBS die Gegenwart von GTP. Conway und Lipmann (78) haben gefunden, daß Poly-U und phenylalanyl-s-RNS*** die Aktivität der GTPase stimulieren. Cashel und Gallant (79) bringen die GTPase-Aktivität in

---

* Bei Enzymreaktionen - Enzym + Substrat bilden einen Enzymsubstratkomplex, der dann in Produkt und Enzym zerfällt ($E + S \rightarrow ES \rightarrow P + E$), ist immer der zweite Schritt vom Enzymsubstratkomplex zum Produkt der Geschwindigkeitsbestimmende.

** Bei der Annahme, daß die chemische Reaktion nach der 0.Ordnung ($\frac{dc}{dt}$ = const.) abläuft, d.h. bei einer Reaktion, die unabhängig von der Konzentration ist, liegt eine Wärmetönung nach einer Sprungfunktion vor.

*** s-RNS = soluble ribonucleic acid (lösl. RNS)

Zusammenhang mit dem RC-Gen bei E.coli, das an der "stringent control" teil hat. Lucas-Lenard und Lipmann (6) haben nachgewiesen, daß die GTP-Hydrolyse wirklich notwendig ist zur Biosynthese von Proteinen. In der Zwischenzeit ist ziemlich sicher, daß die GTPase-Aktivität an die 5-s-RNS im Ribosom gebunden ist (16). Sie wurde sowohl bei Rattenleber, als auch bei Bakterien (Stearothermophilus) nachgewiesen (80). Grummt et al. konnten ebenfalls zeigen, daß an dem 5-s-RNS-Proteinkomplex auch ATPase-Aktivität zu finden ist. Während die GTPase-Aktivität mit dem Elongationsfaktor EFT_u und EFG in Verbindung steht, ist eine Verbindung der ATPase-Aktivität mit den PBS-Vorgängen am Ribosom nicht nachgewiesen. Von verschiedenen Autoren konnte jedoch gezeigt werden, daß die ATPase-Aktivität wichtig ist für die Funktion des Bakterienribosoms. Bei der Bildung des "magic spot" dient ATP als Phosphatdonor für die Bildung von Guanosintetra- und pentaphosphat (78,79).

Diese Arbeiten ließen den Schluß zu, daß an den hier verwendeten Heferibosomen ebenfalls ATPase- und GTPase-Aktivität zu finden sein müßte.

7.3.1. Nachweis der ATPase-Aktivität an Heferibosomen

Lother ist es gelungen, zum ersten Mal ATPase- und GTPase-Aktivität am Heferibosom nachzuweisen*. In Abbildung 25 ist ein Sedimentationsprofil des isolierten Enzyms sowie parallel dazu die ATPase-Aktivität der jeweiligen Enzymfraktionen aufgetragen. Zum Vergleich der Sedimentationsgeschwindigkeit wurde parallel zu den Enzymfraktionen noch t-RNS über einen Gradienten gefahren.

---

*H.Lother unveröffentlichte Ergebnisse

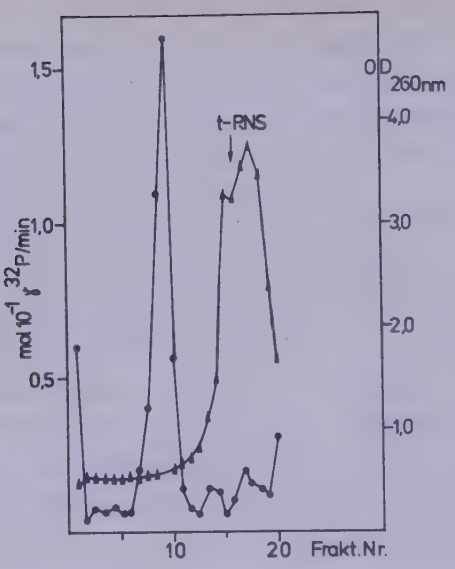


Abb. 25 Sedimentationsprofil und Aktivitätsprofil eines Enzymkomplexes isoliert aus logarithmisch wachsenden Hefen

Aufgetragen: 2 ml Enzym OD_{260}= 232, Zentrifugationszeit 22 h bei 136 000 g im SW 27 Rotor bei 0 C
▲ Sedimentationsprofil, ● ATPase-Aktivität

Die Isolierung des Enzyms wurde nach Vorschriften von Lother durchgeführt*.

Da nun feststand, daß an Heferibosomen ATPase- und GTPase-Aktivität zu finden ist, wurden im Mikrokalorimeter Experimente zum Nachweis der mit dieser Aktivität verbundenen Wärmetönung gemacht.

---

*H. Lother mündliche Mitteilungen

Dazu wurde:

- im biochemischen Ansatz die ATPase-Aktivität von verschiedenen Ribosomenfraktionen und der Einfluß eines Hemmers für Natrium (Na^+), Kalium (K^+) abhängige ATPase auf die Aktivität dieses Enzyms bestimmt. Im Mikrokalorimeter wurde die Wärmetönung dieser Reaktion gemessen.
- der Thermogrammverlauf der ATP-Hydrolyse als Funktion der Substrat- und Enzymkonzentration aufgenommen.
- überprüft, ob mit dem Mikrokalorimeter eine GTPase-Aktivität in der Ribosomenfraktion feststellbar ist.

7.3.2. Biochemische Bestimmung der ATPasen-Aktivität

Schema 10 zeigt die ATPase-Aktivität der verschiedenen Ribosomenfraktionen bestimmt nach Ahlers*. Nach Untersuchungen von Lother** ist die enzymatische Aktivität der ATPase durch 5 bis 10 mM G- Strophantin nur schwach hemmbar (max 20%). In Tabelle 10 sind Ergebnisse zusammengefaßt, die zeigen, daß die Hydrolyseaktivität von nach Schulz-Harder und nach Uttech isolierten Ribosomen durch 10 mM G-Strophantin ebenfalls nur schwach gehemmt wird. Ähnlich ist es bei den nach Lochmann isolierten Ribosomen, obwohl die Fraktionen RF1 und RF4 sehr stark mit Membranteilen durchsetzt sind. Hingegen zeigt sich in der Gesamtaktivität deutlich ein Unterschied zwischen freien (RF_S, RF_N, RF2, RF3) und mit Membranteilen vermischten Ribosomen (Mikrosomen) (RF_P, RF_O, RF1, RF4).

Die Tatsache, daß bei freien Ribosomen noch ATPase-Aktivität zu finden ist, weist darauf hin, daß das Enzym auch im intakten Ribosom aktiv ist.

---

* Bestimmungsansatz nach Ahlers: 100 µl Enzymlösung auf 10 ml, $5 \cdot 10^{-4}$ M ATP-Lösung, TRIS-HCl-Puffer pH 7,8 (Endkonzentration: TRIS-HCl 10^{-1} M, NaCl 10^{-1} M, KCl 10^{-2} M, $MgCl_2$ $5 \cdot 10^{-4}$ M). Zur Inhibition: 1 ml $10 \cdot 10^{-3}$ M G-Strophantinlösung (mdl. Mitteil.)

** mündliche Mitteilung von H. Lother

Schema 10: ATPase-Aktivität verschiedener Ribosomenfraktionen

OD_{260}	Fraktion	Aktivität (µM P_i/min) - G-Strophantin	Aktivität (µM P_i/min) + 10 mM G-Strophantin	% des Vollumsatzes - G-Strophantin
100	RF_S	0,077	0,049	64
100	RF_N	0,079	---	--
100	RF_P	0,825	0,685	83
100	RF_0	0,730	0,594	82
100	RF4	3,5	---	--
100	RF3	0,38	0,47	123
100	RF2	0,41	0,52	127
100	RF1	2,44	2,43	99,5

Reaktionsansatz: 100 µl Enzymlösung auf 10 ml 5 . 10^{-4} M ATP-Lösung, TRIS-HCl-Puffer pH 7,8 (Endkonzentration: 10^{-1} M TRIS-HCl, 10^{-1} M NaCl, 10^{-2} M KCl, 5 . 10^{-4} M $MgCl_2$) zur Inhibition 1 ml G-Strophantin (10 mM)

RF_S= Ribosomen isoliert nach Schulz-Harder über einen Sucrosegradienten gereinigt (s.Schema 2)

RF_N= Ribosomen isoliert nach Schema 2 zusätzlich mit 0,6 M Ammoniumchlorid gewaschen

RF_P= Ribosomen isoliert nach Schema 2, jedoch nur mit Puffer R1 gewaschen anstelle von Brij 58

RF_0= Ribosomen isoliert nach Schema 1 (Uttech)

RF1- RF4 Ribosomen isoliert nach Lochmann, RF3= freie Ribosomen, RF2= Ribosomen mit geringen Membrananteilen, RF1 und RF4 = Ribosomen mit großen Membrananteilen

7.3.3. Bestimmung der Wärmetönung der ATPase-Aktivität im Mikrokalorimeter

Im Mikrokalorimeter wurde zum einen die Wärmetönung dieser Enzymaktivität getestet und zum anderen die Beeinflussung des Thermogrammverlaufs durch Zugabe von G-Strophantin (10 mM) überprüft.

Bei allen Versuchen wurde ATP unten im Reaktionsgefäß und RF und G-Strophantin oben in den Bechern vortemperiert. Zum Start der Reaktion wurden die Lösungen durch Rühren gemischt. Die Reaktionstemperatur betrug 20 C.

In Abbildung 26 sind mehrere Thermogramme von ATP-Hydrolyse mit und ohne Zugabe von G-Strophantin aufgezeichnet. Verwendet wurden, wegen ihrer hohen Aktivität, Ribosomen isoliert nach Schema 1.

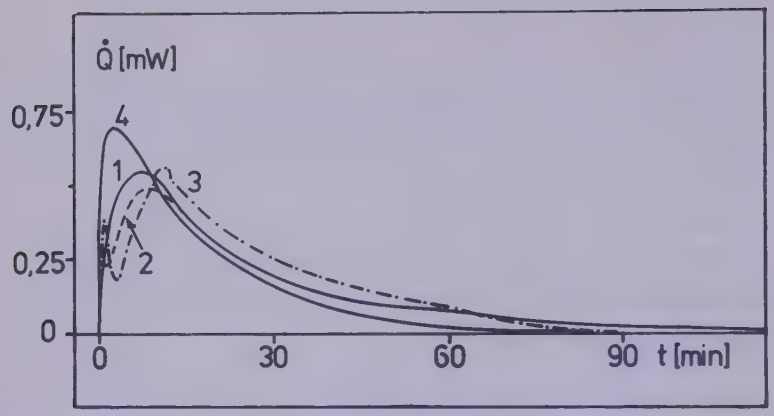


Abb. 26 Thermogramme der ATP-Hydrolyse und ihre Beeinflussung durch Zugabe von G-Strophantin (Zwei verschiedene Isolierungen nach Schema 1)

1: 2 ml ATP (7mg/ml), 0,5 ml RF OD_{260}= 400, -
2: 2 ml ATP (7mg/ml), 0,5 ml RF OD_{260}= 400, 0,5 ml G-Stroph. (0,1mg/ml).
3: 2 ml ATP (7mg/ml), 0,5 ml RF OD_{260}= 400, -
4: 2 ml ATP (7mg/ml), 0,5 ml RF OD_{260}= 400, 0,5 ml G-Stroph. (0,1mg/ml).
ATP und G-Strophantin in TRIS-HCl-Puffer pH 7,8

Aus den Thermogrammen ist deutlich zu entnehmen, daß Ribosomen zusammen mit ATP exotherm reagieren. Die Zugabe von G-Strophantin bewirkt keine starke Veränderung des Thermogrammverlaufs bzw. keine starke Verminderung der Wärmeabgabe.

7.3.3.1. Abhängigkeit des Thermogrammverlaufs von der Enzymkonzentration

Lother hat die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Enzym- und der Substratkonzentration bestimmt. Er hat festgestellt, daß die Enzymkonzentration ein Optimum im Bereich von OD_{260}= 90 und die Substratkonzentration ein Optimum zwischen 5 und 10 . 10^{-4} M ATP hat*. Es wurde nun überprüft, inwieweit die Reaktionsgeschwindigkeit den Thermogrammverlauf beeinflußt**. Als Ausgangspunkt diente die Hypothese, daß der Gesamtumsatz an ATP konstant ist und somit die insgesamt abgegebene Wärme der Reaktion ebenfalls konstant sein müßte. Abbildung 26 zeigt den Thermogrammverlauf in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration (OD_{260}= 9 bis 180) mit konstanter Substratkonzentration(10 . 10^{-4} M ATP).

---

* Lother unveröffentlichte Daten. Der verwendete Inkubationsansatz betrug: 100 µl davon 10 µl Enzym (OD_{260}= 90), 90 µL ATP-Lösung (Puffer A-P) Puffer A-P: 10-100 mM TRIS-HCl, 1mM $MgCl_2$, pH 7,8

** Der Ansatz im Mikrokalorimeter wurde unter denselben Bedingungen wie der biochemische Test durchgeführt, jedoch mit 30-facher Menge Substrat u. Enzym wurden getrennt vortemperiert und zum Start der Reaktion gemischt.

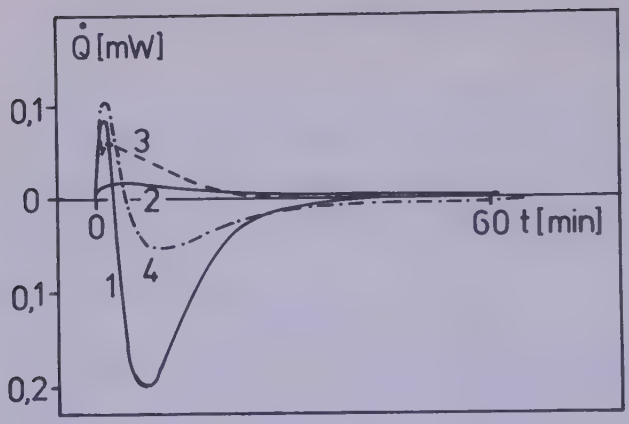


Abb. 27 Abhängigkeit des Thermogrammverlaufs der ATP-Hydrolyse von der Ribosomen-, d.h. der Enzymkonzentration
Alle Ansätze mit 2,7 ml ATP ($10 \cdot 10^{-4}$ M) gelöst in Puffer A-P, pH 7,8 und 0,3 ml Ribosomen RFM
Ribosomenkonzentration:
1: OD_{260}= 9, 2: OD_{260}= 45, 3: OD_{260}=90, 4: OD_{260}=180,
5: OD_{260}= 0 (Thermogramm 5 = Nullinie)

Man sieht, daß die insgesamt abgegebene Wärme nicht konstant ist, sondern von der Enzymkonzentration abhängt.

7.3.3.2. Abhängigkeit des Thermogrammverlaufs von der Substratkonzentration

Es wurde überprüft, inwieweit das Substratangebot einen Einfluß auf den Thermogrammverlauf hat. Dabei wurde von der Hypothese ausgegangen, daß ähnlich wie bei den biochemischen Experimenten ein Optimum des Umsatzes zu erreichen sein müßte. Abbildung 28 a,b und 29 zeigen den Thermogrammverlauf als Funktion der Substratkon-

zentration (20 . 10^{-4} bis 100 . 10^{-4} M ATP)*.

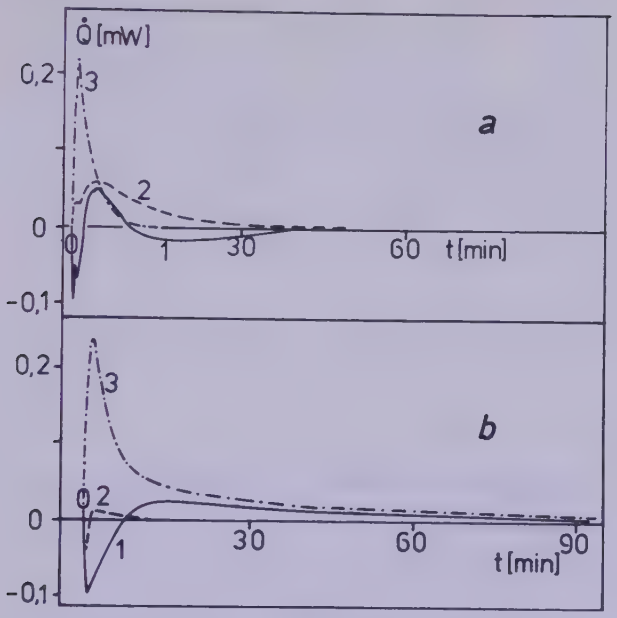


Abb. 28 a,b Abhängigkeit des Thermogrammverlaufs der ATP-Hydrolyse von der Substratkonzentration (RF4, Ribosomen mit hoher ATPase-Aktivität laut biochem. Test Schema 10)

a) 1: 0,3 ml Ribosomen RF4 OD_{260}= 240, 2,7 ml, 20 . 10^{-4} M ATP (A-P-Puffer pH 7,8)

2: 0,3 ml Ribosomen RF4 OD_{260}= 240, 50 . 10^{-4} M ATP (A-P-Puffer pH 7,8)

3: 0,3 ml Ribosomen RF4 OD_{260}= 240, 100 . 10^{-4} M ATP

b) Wie a) jedoch RF4 OD_{260}= 90

---

*Die Magnesiumkonzentration ($MgCl_2$) wurde genau so hoch wie die ATP-Konzentration gewählt. Der Grund ist darin zu sehen, daß ATP zur Reaktion einen Komplex mit Magnesium bilden muß.

Bedenkt man, daß RF4 eine ATPase-Aktivität von 3,5 μMP_i/min hat bei einer Konzentration von OD_{260}= 100 entspr. 11 mg/ml Ribosomenprotein, so müßte, wenn man annimmt, im linearen Bereich der Konzentrationsabhängigkeit zu liegen, bei einer Konzentration von OD_{260}= 240 entspr. 26,5 mg/ml Ribosomenprotein eine Aktivität von 240 µM P_i/min zu erwarten sein. Mit der weiteren Annahme, daß bei der Hydrolyse pro Mol ATP 3 . 10^{-4} J (7 . 10^3 cal) frei werden, ist eine Wärmeabgabe von 7 J/min zu erwarten.
Spätestens nach drei Minuten ist das Maximum des Thermogramms erreicht,und wir nehmen zur Vereinfachung an, daß somit auch das Ende der Reaktion erreicht ist*. D.h. es werden maximal 21 J produziert.

Wie man aus Abbildung 27 entnehmen kann,ist das nicht der Fall, sondern die Wärmeabgabe liegt erheblich darunter. Dasselbe ist auch für die Reaktionen aus Abbildung 28 feststellbar.
Aus Abbildung 28 a,b ist zu entnehmen, daß mit steigender Substratmenge die Wärmeabgabe zunimmt. Bei beiden Versuchsreihen wurden Ribosomenfraktionen mit großer Hydrolyseaktivität verwendet. Nimmt man Ribosomen mit geringer ATPase-Aktivität (RFM), so ist diese Korrelation nicht festzustellen (Abb. 29). Im Gegenteil nimmt mit steigender ATP-Menge der endotherme Teil der Thermogramme zu.

---

* siehe Anhang I

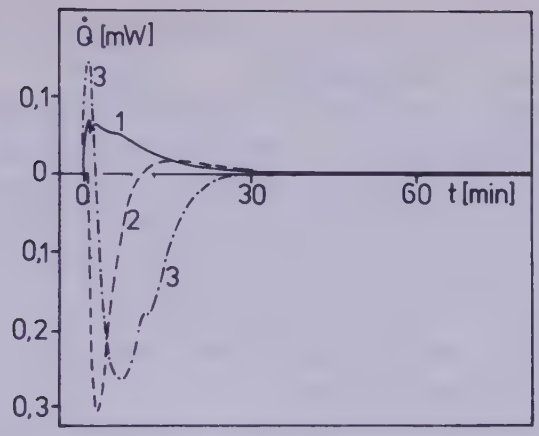


Abb. 29 Abhängigkeit des Thermogrammverlaufs der ATP-Hydrolyse von der Substratmenge (RFM-Hydrolyseaktivität s.Sch.10)

1: 300 µl RFM OD_{260}= 90, 2,7 ml ATP ($20 \cdot 10^{-4}$ M)

2: 300 µl RFM OD_{260}= 90, 2,7 ml ATP ($5 \cdot 10^{-3}$ M)

3: 300 µl RFM OD_{260}= 90, 2,7 ml ATP ($10 \cdot 10^{-3}$ M)

alle Lösungen in A-P-Puffer pH 7,5

7.3.4. Versuch der Einordnung der erhaltenen Thermogramme

Folgende Erklärung für das oben beschriebene Verhalten wäre möglich:

- Es wird nicht genug ATP umgesetzt, um eine starke Wärmeproduktion im Mikrokalorimeter zu registrieren*.

---

*Aus den Abbildungen 26 bis 28 kann man ersehen, daß das Maximum der Wärmeproduktion spätestens nach 10 min erreicht ist. Für eine grobe Abschätzung kann man annehmen, daß nach 10 min die Reaktion ebenfalls beendet ist. Geht man davon aus, daß ungef. 100 µl RFM (OD_{260}= 100) eine Aktivität von 0,08 µM P_i/min (s.Schema 8) haben, so wäre ein Umsatz von 2,4 µM P_i pro Mikrokalorimeteransatz zu erwarten und damit eine Wärmeabgabe von ungef. $6 \cdot 10^{-2}$ J. Eine Erhöhung der Ribosomenkonzentration z.B. um einen Faktor 3 führt nicht zu dem dreifachen Wärmeumsatz (s.Abb. 27,28). Dafür gibt es bis jetzt keine schlüssige Erklärung.

- Unter Zugabe von ATP laufen am Ribosom Prozesse unter Wärmeaufnahme, d.h. endotherm ab.

Es ist zu vermuten, daß hier ähnliche Prozesse wie bei der Hydrolyse von RNS zugrunde liegen. Es wäre zwar von einigem Interesse herauszufinden, welche Prozesse das sind. Für die vorliegende Arbeit genügt es jedoch, die Tatsache festzuhalten. Geht man davon aus, daß ATPase-Aktivität zunehmend mit dem Grad der Reinigung verloren geht, so ergeben sich Hinweise auf die Ursache dafür,

- daß bei den Untersuchungen von Uttech alle erhaltenen Thermogramme exotherm waren, bzw.
- daß mit zunehmender Reinigung der Ribosomen der exotherme Anteil der Thermogramme immer mehr abnimmt.

Aus den Abbildungen 26 bis 29 ist deutlich zu ersehen, daß auch die Thermogramme der ATP-Hydrolyse aus mindestens zwei Prozessen zusammengesetzt sind, einem endothermen und einem exothermen. Geht man davon aus, daß der exotherme Teil, der bei der PBS registriert wird, nur auf enzymatische Prozesse zurückzuführen ist, und vergleicht die abgegebene Wärme von der PBS und der ATP-Hydrolyse, so sieht man, daß die ATP-Hydrolyse allein nicht ausreicht, um den exothermen Anteil zu erklären.

7.3.5. Nachweis von GTPase-Aktivität im Mikrokalorimeter

Auf S. 76 wurde dargestellt, daß nicht nur ATP, sondern auch GTP für den Ablauf der PBS essentiell ist. Man konnte also ebenfalls erwarten, GTPase-Aktivität am Ribosom zu finden. Erste Versuche zum Nachweis von GTPase-Aktivität am Ribosom wurden durchgeführt. Abbildung 30 zeigt den Verlauf von Thermogrammen mit verschiedenen Mengen an Ribosomen und GTP als Energiequelle. Es ist deutlich zu ersehen, daß die Reaktion exotherm verläuft. Schon geringe Ribosomenmengen führen zu deutlichen Effekten. Auch die GTPase-Reaktion scheint aus zwei Prozessen zusammengesetzt zu sein.

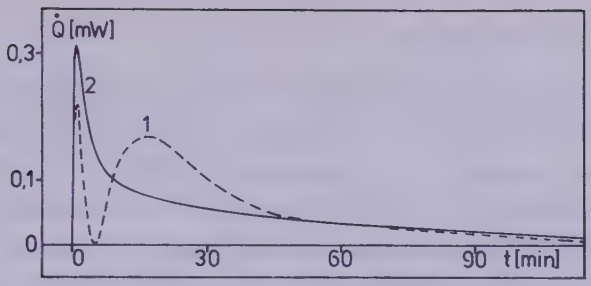


Abb. 30 Thermogrammverlauf der GTP-Hydrolyse durch Ribosomen

1: 500 µl RF OD_{260}= 600, 2 ml GTP (3 mg/ml)

2: 500 µl RF OD_{260}= 900, 2 ml GTP (3 mg/ml)

8. Zusammenfassung und Diskussion

8.1. Zusammenfassung

Das verwendete Mikrokalorimeter bietet die Möglichkeit, die mit einer chemischen Reaktion verbundenen Wärmeflüsse zu messen. Dabei werden kontinuierlich die einzelnen Flüsse addiert und die Summe aller Flüsse registriert. Aussagen über die chemischen Prozesse, die dem Thermogrammverlauf zugrunde liegen, müssen mit Hilfe anderer Methoden erfaßt werden.

Die vorliegende Arbeit ist ein Versuch, die mit der Proteinbiosynthese verbundene Wärmetönung zu erfassen und nach den einzelnen Syntheseabschnitten aufzugliedern.

- Dazu fand ein zellfreies PBS-System aus Hefe Verwendung. Es wurde biochemisch auf seine Syntheseleistung (Einbau von ^{14}C markiertem Phe in eine Peptidkette) und auf seine Komponentenabhängigkeit getestet. Zusätzlich erfolgte durch Variieren der Isolierungs- und Inkubationsmethoden eine Optimierung des Systems (Abschn. 3. und 4.).

- Die Verwertbarkeit für mikrokalorimetrische Experimente wurde dadurch untersucht, daß überprüft wurde, ob bei der Versuchsanordnung im Mikrokalorimeter tatsächlich Peptidsynthese stattfindet, welches die günstigste Versuchstemperatur ist und ob ein Gemisch von verschiedenen Zellfraktionen zu Wärmetönungen führt, obwohl kein Peptid synthetisiert werden kann (Abschn. 4).

Dabei stellte sich heraus, daß:

- vor allem in der Ribosomenfraktion bei Zugabe von MIX Prozesse ablaufen, die mit Wärmeabgabe verbunden sind,
- ein Gemisch von EF, t-RNS, AS und MIX unter Aufnahme von Wärme reagiert entsprechend dem der Aminoacylierung (Abb. 14),
- die Wärmeproduktion abhängig ist von der Menge an MIX und der Ribosomenmenge, die dem System zugeführt werden.

Erste Zweifel daran, daß die im Vollsystem erhaltenen Thermogramme nicht auf PBS zurückzuführen sind, ergaben sich schon aus Untersuchungen von Uttech*. Dabei zeigte sich, daß:

- in Systemen aus E.coli trotz höherer Einbaurate von ^{14}C-Phe in das Peptid eine geringere Wärmeabgabe als im Hefesystem mit geringerer Einbaurate auftrat.

Um festzustellen, wieweit eine spezifische Hemmung der Einbaurate sich auf den Thermogrammverlauf auswirkt, wurden sowohl in das biochemische System d.h. den Ansatz mit ^{14}C-Phe als auch in den mikrokalorimetrischen Systemen Inhibitoren eingesetzt (Abschn. 6). Es zeigt sich, daß im ^{14}C-Phe-Ansatz die Inhibition entsprechend den aus der Literatur zu erwartenden Werten verlief (s.S.50). Eine der verminderten Synthese entsprechende Veränderung der Thermogramme konnte jedoch nur bedingt erhalten werden. Es war nicht möglich, durch gezieltes Hemmen von Syntheseschritten die Thermogramme in einzelne, diesen Schritten entsprechende Abschnitte aufzugliedern.

Das System erwies sich als zu komplex, um aus den Thermogrammen eindeutige Aussagen über die Inhibition der Synthese bzw. die noch ablaufenden Syntheseschritte zuzulassen. Es wurde versucht, einen Weg zu finden,um die mit der PBS verbundene Wärmetönung nachzuweisen, indem einfache Reaktionen getestet wurden, die am bzw. im Ribosom ablaufen. Von diesen Reaktionen war im biochemischen Test nachgewiesen worden, daß sie an den isolierten Ribosomenfraktionen ablaufen (Abschn. 7).

Diese Reaktionen waren:
Hydrolyse der RNS

Von verschiedenen Autoren wird beschrieben, daß RNase-Aktivität fest an das Ribosom gebunden ist (s.Abschn. 7.2.).
In den hier isolierten Ribosomenfraktionen konnte ebenfalls

---

* Uttech unveröffentlichte Ergebnisse

RNase-Aktivität nachgewiesen werden. Bei der mikrokalorimetrischen Untersuchung ergab sich jedoch, daß die RNasen-Aktivität mit käuflicher RNase endotherm verläuft, während die Hydrolyseprozesse am Ribosom exotherm verlaufen. Dabei zeigte sich, daß die Thermogrammverläufe selbst von so einfachen Reaktionen wie der Hydrolyse von RNS nicht eindeutig einer bestimmten Wärmetönung zuzuordnen sind.

Hydrolyse von ATP und GTP

In der Literatur ist ebenfalls beschrieben, daß ATPase- und GTPase-Aktivität an das Ribosom gebunden sind (16,80). Die bei den Thermogrammen der RNS-Hydrolyse aufgetretenen Schwierigkeiten ergaben sich auch bei der Hydrolyse von ATP und GTP. Alle Thermogramme ließen erkennen, daß sie mindestens aus zwei Teilen - einem endothermen und einem exothermen - zusammengesetzt sind. Dasselbe haben schon Benzinger und Kitzinger für Enzymreaktionen beschrieben (74).

Im Anhang I wird versucht, ein einfaches Modell für solche zusammengesetzte Thermogramme zu entwickeln, das es erlaubt, Rückschlüsse auf die Mindestanzahl von an einer Reaktion beteiligten Prozessen zu ziehen und in grober Näherung den Verlauf von Reaktionen zu erfassen.

8.2. Diskussion

Es soll hier dargestellt werden, in welchem Zusammenhang die Untersuchungen der einzelnen Kapitel stehen und wieweit eine Aussage möglich ist über die drei Aspekte, die in der Problemstellung aufgeführt wurden.

1) Ist es grundsätzlich möglich, die mit der PBS verbundene Wärmetönung im Mikrokalorimeter zu erfassen?

2) Welche Prozesse spielen beim Nachweis von PBS im Mikrokalorimeter eine besondere Rolle?

3) Sind die von Uttech erhaltenen Thermogramme auf PBS zurückzuführen?

8.2.1. Ist es grundsätzlich möglich, die mit der PBS verbundene Wärmetönung im Mikrokalorimeter zu erfassen?

Die Bindungsenergie einer Peptidbindung beträgt ungefähr $5 - 6 \cdot 10^3$ cal/Mol ($2 - 3 \cdot 10^4$ J/Mol). Verbraucht werden zur Bildung vermutlich drei Triphosphate (6,80) deren Bindungsenergie ungefähr $2 \cdot 10^4$ cal/Mol ($9 \cdot 10^4$ J/Mol) beträgt, so daß $1 - 2 \cdot 10^4$ cal/Mol ($6 \cdot 10^4$ J/Mol) pro geknüpftes Peptid, in Form von Wärme frei werden kann. Dies entspricht 70% der aufgewendeten Energie. Dies steht in guter Übereinstimmung mit Angaben von Lamprecht, der errechnet hat, daß bei Versuchen in System I etwa 70% der in Form von MIX eingesetzten Energie, wieder als Wärme abgegeben wird. Geht man von einer Syntheseleistung, wie sie auf S. 33 dargestellt ist, aus, so ergeben sich ungefähr $6 \cdot 10^{-6}$ Mol AS/Ansatz. D.h. $6 \cdot 10^{-6}$ Mol Phenylalanin werden pro Versuchsansatz zu Polyphenylalaninpeptiden geknüpft. Nimmt man den Differenzbetrag zwischen der Energie , die zur Bildung verwendet wird, und der Bindungsenergie der Moleküle, so ergibt dies pro Ansatz etwa 2 J, die in Form von Wärme frei werden können.

Berücksichtigt man, daß im mikrokalorimetrischen Experiment nur etwa 50% des in vitro Ansatzes mit ^{14}C-Phe erbracht werden (s.Abb. 8), so ergibt sich eine Wärmeabgabe von etwa 1 J. Rechnet man diese Wärmemenge um in den entsprechenden Wärmefluß, so ergibt sich bei einer Reaktionsdauer von 90 min ein Wärmefluß in der Größenordnung von 10^{-1} mW. Mit dem verwendeten Mikrokalorimeter vom Typ E. Calvet ist jedoch ein Wärmefluß von 10^{-3} mW noch nachweisbar. D.h. die verwendete Meßmethode ist geeignet, die auftretenden Effekte zu registrieren. Bei dieser Abschätzung werden all die Wärmen unterschlagen, die mit der Veränderung von Molekülstrukturen verbunden sind. Traub (61) hat die Enthalpie der Rekonstitution von 30S Ribosomenuntereinheiten berechnet. Sie beträgt $\Delta H = 3,8 \cdot 10^4$ cal/Mol ($1,6 \cdot 10^5$ J/Mol). Schätzt man nun die Rekonstitutionsenthalpie von 80S Ribosomen ab, so muß man folgende Randbedingungen berücksichtigen:

- ΔH von 80S Ribosomen ist ungefähr 2 . ΔH 30S.
- 1 Mol 80S Ribosomen hat ungefähr ein Molekulargewicht von $4 . 10^6$ g.
- die Dauer der Wärmeflußregistrierung im Mikrokalorimeter beträgt bei PBS-Messungen ungefähr 90 min.
- der minimale vom Mikrokalorimeter noch erfaßbare Wärmefluß beträgt etwa 10^{-3} mW.

Die Rechnung ergibt, daß 1 - 2 g Ribosomen eingesetzt werden müssen, um die Rekonstitution gerade noch zu erfassen. In den hier zur PBS verwendeten Ansätzen wurden jedoch immer 22 bis 25 mg Ribosomen eingesetzt. D.h. bei den hier verwendeten Mengen dürfte die Wärmetönung der Rekonstitution vernachlässigbar sein.

Sicherlich gehen auch noch weitere Wärmen von Molekülstrukturveränderungen mit in die Thermogramme ein, z.B. das Zusammenknäulen der Peptide nach der Produktion im Ribosom (81). Es ist jedoch nicht möglich, die einzelnen Energien zu erfassen.

8.2.2. Welche Prozesse spielen beim Nachweis von PBS im Mikrokalorimeter eine besondere Rolle?

8.2.2.1. Störfaktoren, die die Thermogramme beeinflussen.
In Abschnitt 3.1.4. ist dargestellt, welche Reaktionen bedingt durch die Versuchstechnik bei mikrokalorimetrischen Untersuchungen die Thermogramme störend beeinflussen können. Um diese Effekte ausschließen zu können, muß die Methode standartisiert werden. Nach Wadsö (82) wird die Lösungs-, die Misch-, die Verdampfungs-, die Ionisations- und die Reaktionswärme zur Gesamtwärme addiert.
Die Gesamtwärme wird vom Gerät registriert. Bei den durchgeführten Eichversuchen hierzu ergab sich, daß Lösungs-, Ionisations- und Mischwärme aufgrund der Meßanordnung nicht in die Thermogramme mit eingehen. Da sowohl in der Referenz- als auch in der Meßkammer wässrige Lösungen eingesetzt wurden, wurde die Verdampfungswärme als vernachlässigbar angenommen. Nach Wadsö (82) müssen die einzel-

nen Wärmen jeweils bekannt und ermittelt sein, um die Reaktionswärme bestimmen zu können. Das verwendete System ist jedoch zu komplex um ein solches Verfahren zuzulassen. In Tabelle 4 und 5 ist aufgezeigt, nach welchem Verfahren hier die nicht zur Reaktion gehörenden Wärmen ermittelt wurden. Bei Kombinationen von Substanzen, bei denen kein Wärmefluß auftrat, wurden die o.g. Wärmen als vernachlässigbar angenommen.

Der Verlauf der PBS ist bestimmt durch das Einwirken von einer Reihe von verschiedenen Faktoren (s. Schema 6), wie z.B. F_1-F_3, die direkt am Syntheseprozess teilnehmen. Darüber hinaus gibt es jedoch auch solche, die an Zulieferreaktionen bzw. Regulationsmechanismen beteiligt sind. Bei der Art der Gewinnung und Reinigung der verwendeten Zellfraktionen kann man nicht ausschließen, daß solche Faktoren mit im PBS-Ansatz vorhanden sind. Es wäre sicher sinnvoll, völlig reine Fraktionen zu verwenden, denen dann die zur Synthese essentiellen Faktoren zugesetzt werden. Diese Vorgehensweise ist jedoch aufgrund der Isolierungstechnik nicht möglich. Ein Zeichen dafür, wie sehr noch nach Faktoren und ihrer Funktion gesucht wird, ist die Fülle der Literatur auf diesem Gebiet (10,11,83,84,85,86). Es wurde jedoch versucht, eine Optimierung des Systems so durchzuführen, daß es für die Untersuchungen im Mikrokalorimeter verwendbar war. Das bedeutete, jede im biochemischen Ansatz mit ^{14}C-Phe durchgeführte Verbesserung auf ihre Verwertbarkeit für kalorimetrische Ansätze zu überprüfen, da zwischen dem biochemischen und mikrokalorimetrischen Ansatz grundsätzliche methodische Unterschiede bestehen.

Bei diesen Tests zeigt sich, daß:

- ein Gemisch von RF und MIX einen exothermen Wärmefluß produziert (s. Schema 5). Die Wärmeproduktion hängt dabei vom Grad der Reinigung der Ribosomen ab (Abb. 16,17).
- der Thermogrammverlauf der Vollsysteme mit modifizierten Isolierungsmethoden (System II - IV) kaum von der Menge an zugegebener EF abhängt (Abb. 13), bei Systemen , die nach Uttech isoliert wurden (System I), diese Abhängigkeit jedoch stärker ist (Abb. 10).

Diese Ergebnisse bestärkten die Vermutung, daß mit den verwendeten Isolierungsmethoden weder Prozesse in der EF noch in der RF ohne störende Nebenreaktionen abliefen. D.h. es lag die Annahme nahe, daß im Mikrokalorimeter auch andere Effekte als PBS registriert werden, Effekte, die die PBS im ^{14}C-Phe-Ansatz nicht störend beeinflussen.

Zwei Arten von Reaktionen sind dabei zu berücksichtigen:

- die Veränderung der Konfiguration von Molekülen, vor allem die des Ribosoms und
- chemische Reaktionen, wie z.B. enzymatische Prozesse.

Die in Abschnitt 8.2.1. durchgeführte Abschätzung schließt aus, daß die obigen Ergebnisse durch Konfigurationsänderungen am Ribosom verursacht sind.

8.2.2.2. Inhibitionsversuche zur Unterscheidung von Wärmen, die durch PBS und solchen die durch Störfaktoren verursacht sind

Eine einfache Methode zur Unterscheidung von Wärmetönungen, die durch PBS und solchen die durch andere Reaktionen verursacht sind, bot sich mit Versuchen zur gezielten Inhibition der Peptidsynthese. Es wurden Inhibitoren verwendet, die spezifische Schritte der PBS blockieren. Es wurden drei Substanzen gewählt, die sehr verschiedene Wirkungsmechanismen zeigen (s. Abschnitt 6.2.). Zusätzlich

wurde ein Inhibitor, der nur auf mitochondriale PBS wirkt, als Kontrolle für die Reinheit des Systems eingesetzt. Falls die registrierte Wärmetönung auf Peptidsynthese zurückzuführen ist, müßten die Thermogramme charakteristisch verändert sein. Wie aus der Diskussion aus Abschnitt 6.3. und aus Tabelle 7 ersichtlich ist, wurden zwar im biochemischen Test die Inhibitionsergebnisse erzielt, die zu erwarten waren. Die Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Untersuchungen erlaubten jedoch keine genaue Aufschlüsselung der PBS in Einzelschritte. Darüber hinaus zeigte sich, daß das System z.T. mit mitochondrialen Anteilen verunreinigt war.

Der Weg, PBS über das Gesamtsystem zu erfassen und mit Hilfe von gezielt wirkenden Inhibitoren in Einzelschritte einzuteilen, führte nicht zum Ziel. Zwar ergab die Integration der Flächen der Thermogramme der exothermen und endothermen Wärmeflüsse deutlich unterschiedliche Wärmemengen, je nach Art des Inhibitors. Eine Veränderung des Thermogrammverlaufs konnte jedoch nicht erhalten werden. Die Thermogramme verliefen alle so, wie sie in Vollsystemen (s.Abb. 13) zu sehen sind.

Dies liegt nicht nur an der Komplexität der biochemischen Abläufe, sondern auch an der verwendeten Meßmethode. Im Mikrokalorimeter ist es möglich, parallel zu den biochemischen Abläufen Reaktionswärmen zu beobachten, ohne daß Eingriffe von außen - z.B. Probenentnahme - notwendig sind. Wie in Abschnitt 8.2.2.1. schon ausgeführt, ist die jeweils registrierte Wärmeproduktion die Summe aller im System zu einem bestimmten Zeitpunkt ablaufenden Wärmeflüsse. Es ist also nicht möglich, einzelne Wärmeflüsse zu unterscheiden. Im Anhang I wird noch gesondert darauf eingegangen, daß es nicht immer möglich ist, die einer erhaltenen Kurve zugrunde liegenden einzelnen Reaktionsabläufe eindeutig festzulegen.

Für das Problem der Aufschlüsselung der mit der PBS verbundenen Wärmetönungen bedeutet dies:

Herausfinden einiger wichtiger chemisch einfach ablaufender Reaktionen, die mit der PBS zusammenhängen, um so eine Annäherung an die Wärmetönung der Gesamt- bzw. der Störreaktion zu erreichen.

Hierzu standen drei Reaktionen zur Verfügung:

1. die Hydrolyse der RNS durch RNase

Diese Reaktion ist deshalb von Bedeutung, weil es nicht gelungen ist, Ribosomenfraktionen ohne jede RNase-Aktivität herzustellen (s. Abschnitt 7.2.) und weil diese Reaktion eine zentrale Stellung im Regulationsmechanismus der PBS einnimmt (73). Chet et al. konnten nachweisen, daß die RNasen-Aktivität abhängig ist von der Intensität der Proteinsynthese in vivo. Sie stellten die Theorie auf, daß die Zelldifferentiation von vermutlich den meisten Pflanzenzellen durch einen schnellen Turnover der RNS gesteuert wird, bei dem RNase für alle Degradationsprozesse verantwortlich ist. Hieraus ergibt sich, daß RNS eine der zentralen, die PBS begleitenden Reaktionen ist, die nicht direkt zur Synthese gehören - für die vorliegende Untersuchung eine Störreaktion. Im biochemischen Ansatz verläuft sie spontan und ohne Verbrauch von energiereichen Verbindungen wie ATP oder GTP. Werden käufliche Substanzen (RNase, RNS) eingesetzt, so überwiegt in den Thermogrammen der endotherme Anteil (s.Abb. 23). Gibt man zum Reaktionsansatz Ribosomen, so werden nur noch exotherme Wärmeflüsse registriert (Abb. 21). Die Ursache dieses Verhaltens wurde nicht weiter untersucht, da sie über den Rahmen der Arbeit hinausgehen. Es bleibt jedoch festzustellen, ein Gemisch von Ribosomen und RNS reagiert unter Abgabe von Wärme.

2. die Spaltung von ATP durch ATPase, sowie
3. die Spaltung von GTP durch GTPase

Sie beliefern die PBS mit der notwendigen Energie zur Knüpfung der Peptidbindung.

Bei dem von Lother im Heferibosom nachgewiesenen ATPase-Enzym handelt es sich um ein Enzym, das mit RNS komplexiert ist und zusätzlich zur Hydrolyse auch noch Kinaseaktivität aufweist*. D.h. es katalysiert auch die Anlagerung von Phosphat an ribosomale RNS. Bei dieser Aktivität ist es durchaus möglich, daß die gemessene Wärmebilanz gleich Null ist. Tatsächlich tritt ein Verhalten auf, bei dem die Wärmeflüsse erheblich unter der zu erwartenden Spaltungsenergie von ATP (87) liegen. Teilweise werden auch endotherme Prozesse verzeichnet. Der Stand der Experimente läßt jedoch den Schluß, daß tatsächlich ein Zusammenhang zwischen dieser Erklärung und dem Versuchsablauf besteht, nicht zu. Es wäre durchaus möglich, daß, wie bei der RNS-Hydrolyse gefunden wurde, die Komplexbildung zwischen Substrat und Enzym stark endotherm verläuft.

Ähnliches wie für die ATPase-Reaktion gilt auch für die GTPase-Reaktion. Die GTPase-Aktivität ist an das Ribosom gebunden (80, 13). Soweit das Enzym bis jetzt bekannt ist, besitzt es jedoch keine Kinase-Aktivität.

Die Thermogramme der GTP-Hydrolyse sind ebenfalls aus mindestens zwei Prozessen zusammengesetzt.

Es wäre sicher ein sinnvoller Beitrag zur Erfassung der mit der PBS verbundenen Wärmetönung, wenn es gelingen würde, die genaue Wärmetönung der ATP- und GTP-Hydrolyse zu erfassen, in Zusammenhang mit genauen Angaben zur Funktion dieser Enzyme.

---

* H. Lother unveröffentlichte Ergebnisse

8.2.3. Sind die von Uttech erhaltenen Thermogramme auf PBS zurückzuführen?

Die Probleme, die unter 8.1. und 8.2. dargestellt wurden, lassen deutlich erkennen, daß Wärmeflüsse, die im Mikrokalorimeter mit PBS-Systemen erzeugt werden, nicht zwangsläufig auf PBS zurückzuführen sind.

Die Tatsache, daß in den Systemen von Uttech

- die Einbaurate an ^{14}C-Phe im biochemischen Ansatz kaum Einfluß auf die Thermogramme hat,
- das Weglassen von essentiellen Faktoren wenig Einfluß auf die Thermogramme hat,
- Ribosomen zusammen mit MIX Wärme produzieren, ohne daß PBS stattfindet,
- Inhibition der PBS im ^{14}C-Phe Ansatz keinen Einfluß auf die Thermogramme hat,
- der pH-Wert der isolierten Fraktionen nicht einheitlich eingestellt wurde,

zeigt, daß die von Uttech erhaltenen Thermogramme zwar im Zusammenhang mit der PBS stehen, jedoch nicht ausschließlich auf PBS zurückzuführen sind. Es ist sogar anzunehmen, daß sie zum größten Teil durch Reaktionen, die die PBS begleiten, verursacht sind.

8.3. Kurzer Ausblick

Auf Grund der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse muß man sagen, daß das Aufschlüsseln von Wärmetönungen komplexer Reaktionen nur dann möglich ist, wenn

- die Einzelreaktionen, die dem Gesamtprozess zugrunde liegen, nicht interessieren, wie dies z.B. beim Erfassen von Wachstumsvorgängen der Fall ist (25).
- keine störenden Reaktionen auftreten, die sich dem System überlagern.

Dies ist jedoch in keinem Fall möglich, da,wie von Wadsö (82) und Kitzinger und Benzinger (87) und auch in dieser Arbeit (Abschn. 7, Anhang I) gezeigt wurde, einfache Reaktionen schon zu einer Fülle von Nebenerscheinungen führen.

Die Aufschlüsselung einer so komplexen Reaktion wie der PBS ist nur möglich über einzelne Schritte, die wenn sie genau erfasst sind, kombiniert werden können.

Anhang I

Modell zur Erklärung von zusammengesetzten Thermogrammen am Beispiel der RNS-Hydrolyse

Im folgenden soll ein Modell entwickelt werden, mit dem in grober Näherung der Verlauf von Enzymreaktionen beschrieben werden kann. Die Brauchbarkeit soll an Hand von Modellversuchen getestet werden.

Eine Enzymreaktion läuft nach folgendem Muster ab:

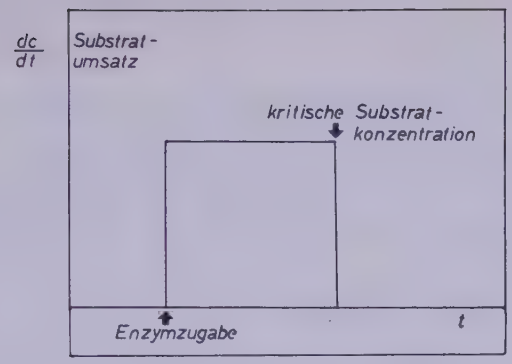
$$E_{nzym} + S_{ubstrat} \underset{v_{-1}}{\overset{v_1}{\rightleftarrows}} ES_{komplex} \longrightarrow P_{rodukt} + E^{*}$$

In den vorliegenden Untersuchungen zur Spaltung von RNS durch RNase wurde im photometrischen Test die Menge an gebildetem Produkt bestimmt. Aus diesen Untersuchungen ergab sich, daß bei Enzymkonzentrationen, wie sie im kalorimetrischen Test verwendet wurden, d.h. über 0,15 mg/ml RNase, die Reaktion augenblicklich ihre maximale Geschwindigkeit erreichte. Da die Komplexbildung (ES) der Produktproduktion vorangeht, kann man annehmen, daß beide Prozesse, d.h. Komplexbildung zwischen RNase und RNS und Produktbildung von RNS-Bruchstücken, sofort ihre maximale Geschwindigkeit erreichen.

Es ist also vertretbar, für den Anstieg der Reaktion eine Sprungfunktion anzunehmen. Die Hydrolysereaktion selbst ist substratabhängig. D.h. die Geschwindigkeit der Produktbildung nimmt mit abnehmender Substratkonzentration ab. Wir nehmen zur Vereinfachung jedoch an, daß ab einer kritischen Substratkonzentration die Reaktion stoppt, so daß das Ende der Reaktion ebenfalls durch eine Sprungfunktion darstellbar ist.

---

* Für die rechnerische Behandlung von Enzymreaktionen ist es wichtig, daß im allgemeinen die Reaktion ES--→ E + P wesentlich langsamer abläuft, als die Reaktion E + S--→ES.



Die Wärmeproduktion, die mit der Reaktion verbunden ist, verläuft dann ebenfalls als Sprungfunktion.

Wie wir aus den Abbildungen 23,24 entnehmen können, verlaufen die registrierten Thermogramme keineswegs als Sprungfunktion. Ein Grund dafür ist die Trägheit der Anzeige, die durch die Zeitkonstante des Gerätes entsteht. Nach Calvet und Camia (75) verläuft der Anstieg einer Kalorimeterkurve entsprechend folgender Funktion:

$$x = x_o \, (1 - e^{-\omega t})$$ wobei ω das Inverse der Zeitkonstante ist $\frac{1}{\tau}$

Der Abfall einer Kurve erfolgt entsprechend der Funktion:

$$x = x_o \, e^{-\omega t}$$

Wir können daraus entnehmen, daß bei Reaktionen, die kürzer sind oder in der Größenordnung der Zeitkonstante liegen, der angezeigte Maximalausschlag nicht dem tatsächlichen Wärmefluß entspricht. Dies ist erst der Fall bei einer Reaktionsdauer, die erheblich größer ist als τ, mindestens $4\,\tau$ (s. 75).

Für die Aufstellung eines Modells zur groben Näherung an den Verlauf der Thermogramme und die Zahl der ihnen zugrunde liegenden Prozesse bedeutet dies:
Man überlagert mehrere exo- und endotherme Rechteckprozesse und schätzt für jeden Prozess den Verlauf des Thermogramms ab.
Dabei stellt sich heraus, daß zur Konstruktion von Thermogrammen, wie sie in Abbildung 23,24 dargestellt sind, zwei Rechteckprozesse genügen.

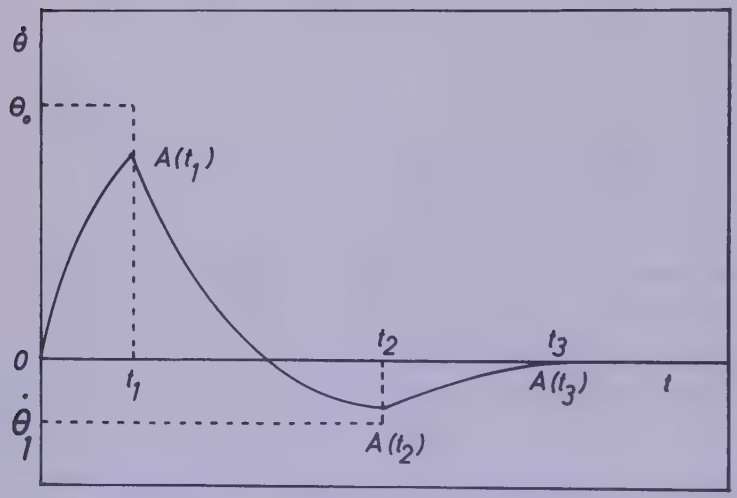


Abb. 31 Konstruktion eines Thermogrammverlaufs mit Hilfe von Rechteckprozessen

--- Wärmeproduktion der Reaktion in relativen Einheiten
—— Thermogrammverlauf

Zur Beschreibung des Thermogrammverlaufs kann man folgendes Gleichungssystem aufstellen:

Für den Anstieg des Thermogramms gilt:

$$A(t_1) = \theta_o(1 - e^{-\omega t}) \qquad \text{für: } 0 < t \leq t_1$$

Für den Abfall der Kurve und das Einlaufen in den 2. Peak:

$$A(t_2) = A(t_1) + \theta_1 \ (1 - e^{-\omega(t-t_1)}) \qquad \text{für: } t_1 < t \leq t_2$$

Für das Zurückschwingen auf die Nullinie:

$$A(t_3) = A(t_1) + A(t_2)(e^{-\omega(t-t2)}) \qquad \text{für: } t_2 < t \leq t_3$$

Es zeigt sich, daß dieses Gleichungssystem nur bedingt geeignet ist, Aufschluß über Thermogrammen zugrunde liegende Reaktionen zu geben, da θ_o, θ_1, t_1, t_2 bestimmt werden müssen, wobei t_3 und die Gerätekonstante ω $(\frac{1}{C})$ bekannt sind. D.h. bei Prozessen, deren Dauer nicht bekannt ist, ist es nicht möglich, die Intensität zu bestimmen bzw. umgekehrt. Trotzdem ist das Modell als qualitative Näherung an chemische Prozesse geeignet. Es erlaubt, die Mindestanzahl von an einer Reaktion beteiligten Prozessen zu erfassen.

Dazu wurde versucht, mit zwei sich überlagernden Rechteckimpulsen mit entgegengesetzter Wärmetönung solche Kurven zu simulieren. In Abbildung 32 sind einige so erhaltene Modell-Thermogramme aufgezeichnet.

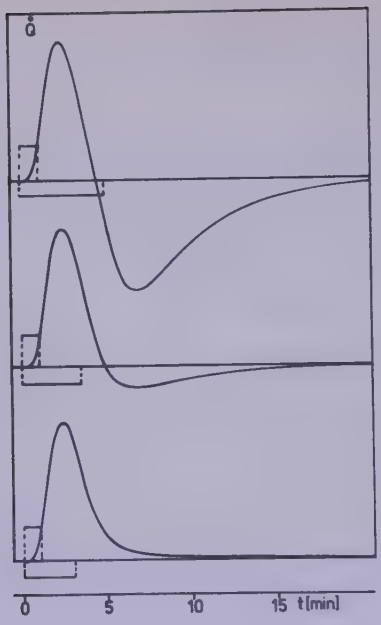


Abb. 32 Modellthermogramme

——Heizimpulse in relativen Einheiten
——Thermogrammverlauf

Als Vergleich für das Thermogrammverhalten von durch Heizimpulsen und durch chemische Reaktionen verursachten Thermogrammen, ist hier noch einmal Abbildung 24 aufgeführt, auf der die Wärmeproduktion in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration aufgetragen ist.

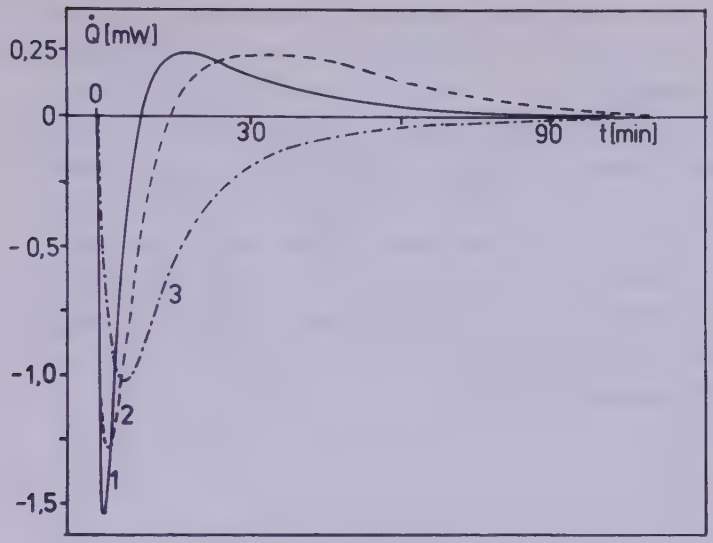


Abb. 24 Änderung des Thermogrammverlaufs in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bei konstanter Substratmenge

1: 1,0 ml RNase (1,5 mg/ml), 2,5 ml RNS (30 mg/ml)
2: 1,0 ml RNase (0,15 mg/ml), 2,5 ml RNS (30 mg/ml)
3: 1,0 ml RNase (0,015 mg/ml), 2,5 ml RNS (30 mg/ml)

Man sieht, daß mit dem vorliegenden Modell eine recht gute Näherung an solche Reaktionen möglich ist.
Schon geringe Unterschiede in der Enzymkonzentration bzw. der Heizleistung erzeugen erhebliche Veränderungen der Thermogramme.

Es ist ebenfalls aus beiden Darstellungen ersichtlich, daß ein eindeutiger Rückschluß von der Thermogrammform auf die Zahl und die Reaktionsordnung der beteiligten Prozesse nicht möglich ist.

Das vorliegende Modell gibt nur eine qualitative Beschreibung der Thermogramme wieder.
Ein weiteres Verhalten ist aus den simulierten Kurven noch zu ersehen, das ebenfalls allen Prozessen zugrunde liegt. Mit Beendigung

eines Heizimpulses ist nicht gleichzeitig ein Maximum eines Thermogramms erreicht. Die Thermogrammkurve steigt bzw. fällt noch einige Zeit in Abhängigkeit von der Geschichte des Systems, d.h. der Länge und Intensität der Heizimpulse weiter. Dieses Verhalten muß durch ein Wärmeleitungsproblem erklärt werden, auf das hier nicht näher eingegangen werden kann. Als Erklärung genügt hier, daß zum Zeitpunkt, zu dem die Wärme in der Kammer produziert wird, sie noch nicht an der Meßstelle, d.h. an den Thermoelementen, angelangt ist. Die Dauer die sie braucht, um diese Strecke zu überwinden, hängt von der Wärmekapazität des Systems, d.h. von dem Material und dem Inhalt der Meßkammer ab.

Anhang II

Folgende Medien wurden verwendet:

Zur Anzucht von Hefen:

2% Glukose

1% Difco Yeast Extract

0, 5% Pepton

Spuren von Antischaum

Autoklaviert bei:

115 C, 30 min

Zur Anzucht von Bakterien:

Vollmedium:

1% Trypton

0, ?% Difco Yeast Extract

5 vol% Frazer Mix

auf 97% des gewünschten Volumens auffüllen und

autoklavieren bei: 115 C, 30 min

dann 3vol% sterilen Phosphatmix dazugeben.

Spuren von Antischaum

Phosphatmix:

0, 1% Gelatine

0, 65% Kalziumchlorid ($CaCl_2$)

2% Ammoniumchlorid (NH_4Cl)

1, 23% Magnesiumsulfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

auffüllen auf 50% des gewünschten Volumens und dann

50 vol% Glyzerin (steril) dazugeben.

Phosphatmix:

11, 53% Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

32, 56% Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)

auffüllen auf das gewünschte Volumen und bei 115 C, 30 min autoklavieren

Folgende Puffer fanden Verwendung:

TMA-B	pH 7, 5
TRIS-HCl	$3,0 \cdot 10^{-2}$ M
Mg-acetat	$1,0 \cdot 10^{-2}$ M
NH_4Cl	$2,2 \cdot 10^{-2}$ M
2-Mercapto-äthanol	$1,0 \cdot 10^{-3}$ M

TMA-A	pH 8, 0
TRIS-HCl	$2,0 \cdot 10^{-2}$ M
$MgCl_2$	$8,5 \cdot 10^{-3}$ M
NH_4Cl	$2,2 \cdot 10^{-2}$ M
2-Mercapto-äthanol	$2,0 \cdot 10^{-3}$ M

TMA-I	pH 7, 8
TRIS-HCl	$1,0 \cdot 10^{-2}$ M
$MgCl_2$	$1,0 \cdot 10^{-2}$ M
NH_4Cl	$3,0 \cdot 10^{-3}$ M
2-Mercapto-äthanol	$6,0 \cdot 10^{-3}$ M

Ribosomenisolierungspuffer, R1 bis R3

R1	pH 7,5
TRIS-HCl	$3,0 \cdot 10^{-2}$ M
KCl	$2,0 \cdot 10^{-1}$ M
Mg-acetat	$5,0 \cdot 10^{-3}$ M
Sucrose	$2,0 \cdot 10^{-1}$ M
EDTA	$2,5 \cdot 10^{-4}$ M
2-Mercapto-äthanol	$1,0 \cdot 10^{-2}$ M

R2	pH 7,5
TRIS-HCl	$3,0 \cdot 10^{-2}$ M
KCl	$2,0 \cdot 10^{-1}$ M
Mg-acetat	$5,0 \cdot 10^{-3}$ M
EDTA	$2,5 \cdot 10^{-4}$ M
2-Mercapto-äthanol	$1,0 \cdot 10^{-2}$ M

R3	pH 7,5
TRIS-HCl	$3,0 \cdot 10^{-2}$ M
KCl	$5,0 \cdot 10^{-2}$ M
Mg-acetat	$5,0 \cdot 10^{-3}$ M
EDTA	$2,5 \cdot 10^{-4}$ M
2-Mercapto-äthanol	$1,0 \cdot 10^{-2}$ M

A-P-Puffer	pH 7,5
$MgCl_2$	$1 \cdot 10^{-3}$ M
KCl	$1 \cdot 10^{-1}$ M
TRIS-HCl	$1 \cdot 10^{-1}$ M
2-Mercapto-äthanol	$6 \cdot 10^{-3}$ M

TRIS-HCl, EDTA-Puffer pH 7,5

TRIS-HCl $2 \cdot 10^{-1}$ M

wird 2:1 gemischt mit

EDTA $2 \cdot 10^{-2}$ M

Folgende Mixsorten wurden verwendet:

MIX II_a pH 7,5 (nach Uttech)

ATP $1,0 \cdot 10^{-2}$ M

GTP $1,0 \cdot 10^{-2}$ M

PeP $4,0 \cdot 10^{-3}$ M

PeP-Kinase 25 µl/ml MIX IIa

Gelöst wurden die Substanzen in H_2O-bidestilliert.

Der pH-Wert wurde mit Eisessig und NH_4Cl eingestellt.

MIX pH 7,5 (nach Schulz-Harder)

ATP $2,0 \cdot 10^{-2}$ M

GTP $3,0 \cdot 10^{-3}$ M

PeP $1,0 \cdot 10^{-2}$ M

PeP-Kinase 25 µl /ml MIX

Gelöst wurden die Substanzen in H_2O-bidestilliert.

Der pH-Wert wurde mit KOH und Eisessig eingestellt.

Folgende Chemikalien fanden Verwendung:

von der Firma Merck:

Ammoniumchlorid (NH_4Cl)

Äthanol

Dikaliumhydrogenphosphat	(K_2HPO_4)
Essigsäure	(Eisessig)
Gelatine	
Glukose	
Glyzerin	
Kalziumchlorid	($CaCl_2$)
Kaliumdihydrogenphosphat	(KH_2PO_4)
Kaliumhydroxid	(KOH)
Magnesiumacetat	(Mg-acetat)
Magnesiumchlorid	($MgCl_2$)
Magnesiumsulfat	($MgSO_4$)
Phenylalanin	(Phe)
Trichloressigsäure	(TCA)
Trihydroxymethylammonium-methan	(TRIS-HCl)
Triplex III oder EDTA	
Uranylacetat	

von der Firma Serva:

Adenosintriphosphat	(ATP)
Chloramphenicol	
Guanosintriphosphat	(GTP)
Sucrose	
2-Mercaptoäthanol	
Brij 58	
Sephadex G 75	

von der Firma Boehringer Mannheim:

Phosphoenolpyruvat	(PeP)
Phosphoenolpyruvat-Kinase	(PeP-Kinase)
Polyuridylsäure	(Poly-U)
Ribonuclease	(RNase)

Transfer-Ribonucleinsäure (t-RNS)
von Hefen und Bakterien

von der Firma Calbiochem:

Cycloheximid

Puromycin

von der Firma Difco:

Yeast-Extract

Pepton

Trypton

von der Firma New England Nuclear Chemicals:

^{14}C-Phenylalanin (^{14}C-Phe)

Ein Geschenk von Dr. D. Schweiger vom Max Planck Institut für Molekulare Biologie, 1 Berlin 33, Ihnestraße 63 :

Fussidinsäure

9. Literaturverzeichnis

1. Crick, F., Symp.Soc.Exp.Biol., "The Biological Replication of Macromolecules", XII (1958), 138

2. Coenen, R., Fehrenbach, Fritsch und Goetzmann, "Alternative zur Umweltmisere", C. Hanser Verlag, München 1972

3. Gottlieb, D. and P. Shaw (eds.), Antibiotics I, "Mechanism of Action", Springer Verlag, Berlin 1967

4. Zamecnik, P. and E. Keller, J.Biol.Chem. 209, 337 (1957)

5. Feix, G., Naturwiss. Rundschau 24, Heft 9, 369 (1971)

6. Lucas-Lenard, J. and F. Lipmann, Ann.Rev.Biochem. 40, 409 (1971)

7. Nirenberg, M.W. and H.J. Mathei, Biochemistry 47, 1588 (1971)

8. van der Zeijst, B., K.Engel and H.Bloemers, Biochim.biophys. Acta 294, 517 (1973)

9. Heridia, C. and H.Halvorson, Biochemistry 5, 946 (1966)

10. Pain, V. and M.Clemens, FEBS Letters 32, 205 (1973)

11. Ilan, J., J.Mol.Biol. 77, 437 (1973)

12. Spirin, A., aus "Molekularbiologie, Biochemie und Biophysik": The Ribosome, Vol.IV, Springer Verlag Berlin 1969

13. Ballesta, J. and D. Vazques, FEBS Letters 28, 337 (1972)

14. Anderson, J., M.Bretscher, B.Clark and K. Marcker, Nature 215, 490 (1967)

15. Blobel, G., Proc.Nat.Acad.Sci. (USA) 68, 1881 (1971)

16. Horne,J. and V.Erdmann, Proc.Nat.Acad.Sci. (USA) 70, 2870 (1973)

17. Uttech, K., Dissertation Freie Universität Berlin, 1972

18. Uttech, K., I.Lamprecht and E.-R.Lochmann, Proceedings of the 1. European Biophysics Congress, Vol. IV, S.385 (1971)

19. Lamprecht, I.,E.-R.Lochmann, I.Pietsch and K.Uttech, " Protides of the Biological Fluids", ed. by Peeters, Pergamon Press, 1973

20. Laskowski, W., Z.Naturforschg. 17b, 93 (1962)

21. Schulz-Harder, B., Diplomarbeit Freie Universität Berlin, 1973

22. Nomura, M. and V.Erdmann, Nature 228, 774 (1970)

23. Arlinghaus, R. and R.Ascione, "Methods in Molecular Biology", Vol, 2, ed. by J.A.Last and A.J.Laskin, Marcel Dekker Inc., New York, 1972

24. Calvet, E. et H.Prat, " Microcalorimetrie-Applications physio-chimiques et Biologiques", Paris 1956

25. Lamprecht, I., Dissertation Freie Universität Berlin, 1969

26. Richter, D. and F.Klink, Biochemistry 6, 3569 (1967)

27. Downey, K., A. So and E. Dawie, Biochemistry 4, 1702 (1965)

28. Dieminger, L., Z.Naturforschg. 28c, 66 (1973)

29. Sabbatini, D., N. Borgese and M.Adelmann, aus " RNA viruses, replication and structure", Vol.27, FEBS Proc. of the 8th Meeting, Amsterdam 1972, ed. by North Holland Publ.Comp., Amsterdam

30. Venkatesan, N. and W. Steele, Biochim.biophys.Acta 287, 526 (1972)

31. Hanna, N., G.Bellemare and C. Godin, Biochim.biophys.Acta 331, 141 (1973)

32. Lagerkvist, U. and J. Waldenström, J.Mol.Biol. 8, 28 (1964)

33. Makmann, M. and G. Cantoni, Biochemistry 4, 1434 (1965)

34. Fasiolo, F., N.Berfort, Y.Boulanger and J.-P.Ebel, Biochim. biophys.Acta 217, 305 (1970)

35. Lother, H., Diplomarbeit Freie Universität Berlin, 1973

36. Pestka, S., Ann.Rev.Biochem. 40, 697 (1971)

37. Pestka, S., Ann.Rev.Microbiol. 25, 487 (1971)

38. Hartmann, G., W. Behr, K.A.Beissner, K.Honikel and A.Sippel, Angew. Chemie 80, Nr. 18, 710 (1968)

39. Monro, R. and D. Vazques, J.Mol.Biol. 28, 161 (1967)

40. Kaji, A., aus: " Progress in molecular and subcellular biology", Vol. 3 : Mechanism of Proteinsynthesis and Use of Inhibitors, ed. by F. Hahn, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1973

41. Nomura, M. and C. Lowry, Proc.Nat.Acad.Sci. (USA) 58 946 (1967)

42. Zasloff, M. and S. Ochoa, J.Mol.Biol. 73, 65 (1973)

43. Leader, P.and I.Wool, Biochim.biophys.Acta 262, 360 (1972)

44. Lockwood, A., R. Prasonta, P. Chakraborty and U. Maitra Proc.Nat.Acad.Sci. (USA) 68, 3122 (1971)

45. Shafritz, D., D.Laycock, R.Crystal and W.Anderson, Proc.Nat Acad.Sci. (USA) 68, 2246 (1971)

46. Tach, S. and B. Tacha, Nature NB 229, 219 (1971)

47. Obrig, T., W.Culp, McKeehan, L.Walace and B.Hardesty, J.Biol.Chem. 246, 174 (1971)

48. Warner, J. and A. Rich, Proc.Nat.Acad.Sci. (USA), 51, 1134 (1964)

49. McKeehan, L.Wallace and B.Hardesty, J.Biol.Chem. 244, 4330 (1969)

50. Schneir, M. and K.Moldave, Biochim.biophys.Acta 166, 58 (1968)

51. Spyrides, G. Proc.Nat.Acad.Sci. (USA), 51, 1220 (1964)

52. Arlinghaus, R., J.Shaeffer and R.Sweet, Proc.Nat.Acad.Sci. (USA) 51, 1291 (1964)

53. Alleen, D. and P.Zamecnik, Biochim.biophys.Acta 55, 865 (1962)

54. Pestka, S., Cold.Spr.Harb.Symp.quant.Biol. 34, 395 (1969)

55. Pestka, S., Biochem.Biophys.Res.Commun. 36, 589 (1969)

56. Monro, R., R.Fernandez-Muñoz, M.Celma, A.Jiménez and D.Vazques, aus : Proc. of the 6th Internat.Congress of Chemotherapy, Tokio, 1970

57. Celma, M., R.Monro, D.Vazques, FEBS Letters 6, 273 (1970)

58. Vazques, D., E.Battaner, R.Neth, G.Heller and R.Monro Cold Spring Harbour Symp. Quant Biol. 34, 369 (1969)

59. Chesters, J., Biochim.biophys.Acta 114, 385 (1966)

60. Battaner, E. and D. Vazques, Biochim.biophys.Acta 254, 316 (1971)

61. Traub, P., Current Topics of Microbiology and Immunology, Band 52, S. 1, Springer Verlag, Berlin 1970

62. Santer, M., Science 141, 1049 (1963)

63. Pinder, J. and W. Gratzer, Eur.J.Biochem. 26, 73 (1972)

64. Shiguera, H. and E. Chargaff, Biochim.Biophys.Acta 37, 347 (1969)

65. Nigel Godson, G. and R.Cox, Biochim.biophys.Acta 204, 489 (1970)

66. Cotter, R., P.McPhie and W.Gratzer, Nature 216, 864 (1967)

67. Cox, R., Biochem.J. 114, 73 (1969)

68. Ceri, H. and P. Maeba, Biochim.biophys.Acta 312, 337 (1973)

69. Uchida, T. and F.Egami, " Proc. in Nucleic Acid Research", C.Cantoni and Davies, Harper and Row, New York, 1966

70. Menninger, J., S. Deery, D. Draper and Ch. Walker, Biochim. biophys. Acta 335, 185 (1974)

71. Kössel, H. and R. Bhandary, J. Mol. Biol. 35, 539 (1968)

72. Jost, J.-P. and R. Bock, J. Biol. Chem. 244, 5866 (1969)

73. Chet, I., N. Retig and Y. Henis, Biochim. biophys. Acta 294, 343 (1973)

74. Benzinger, T. and C. Kitzinger, aus : Temperature - its Measurement and Control in Science and Industry, Vol. 3, New York, 1973

75. Calvet, E. and F. Camia, J. chimie physique 55, 818 (1958)

76. Keller, E. and P. Zamecnik, J. Biol. Chem. 221, 45 (1965)

77. Carrasco, L. and D. Vazques, FEBS-Letters 32, 152 (1973)

78. Conway, T. and F. Lipmann, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 52, 1463 (1964)

79. Cashell, M. and I. Gallant Nature 221, 838 (1969)

80. Grummt, F., I. Grummt and V. Erdmann, Eur. J. Biochem. 43, 343 (1973)

81. Goldsack, D and R. Chalifoux, J. Theor. Biol. 39, 645 (1973)

82. Wadsö, I., aus: Biochem. Microcalorimetry, Kap. III, S. 83, ed. by H. Brown, London 1969

83. Chinail, G. and A. Parmegiani, Eur. J. Biochem. 32, 463 (1972)

84. Hershey, J., K. Dewey and R. Thach, Nature 222, 944 (1969)

85. Wahba, J., Y.-B. Chae, K. Iwasaki, R. Mazumder, M. Miller, S. Sabol and M. Sillero, Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 34, 285 (1969)

86. Gasior, E. and K. Moldave, J. Mol. Biol. 66, 391 (1972)

87. Kitzinger, C. and Benzinger, Z. Naturforschg. 10b, 375 (1955)

Danksagung

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Mai 1972 bis Mai 1974 am Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin durchgeführt. Sie erfolgten in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen Biophysik und Molekularbiologie.

Die wissenschaftliche Betreuung hatten Herr Dr. I. Lamprecht (für den physikalischen Bereich) und Herr Prof. Dr. E.R. Lochmann (für den molekularbiologischen Bereich).

Beiden Herren möchte ich herzlich für ihre Unterstützung danken.

Ebenfalls möchte ich allen Mitgliedern der beiden Arbeitsgruppen danken, ohne deren Unterstützung ich das Pendeln zwischen zwei verschiedenen Häusern gelegenen Arbeitsplätzen nicht so gut hätte lösen können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn G.Bjeske für den Bau verschiedener Mikrokalorimeterkammern und vor allen Dingen Frau G.Welge, die durch ihre technische Assistenz wesentlich zum Gelingen der Experimente beitrug.

Herrn Prof. Dr. K. Haubold vom Fachbereich IV der Universität Oldenburg möchte ich für hilfreiche Diskussionen beim Auswerten der Ergebnisse danken.

Lebenslauf

Ich, Luise Berthe-Corti, wurde am 22. März 1948 in Rielasingen als Tochter des Schlossers Josef Corti und seiner Frau Gertrud geb. Jehle geboren.

In Singen besuchte ich die Grundschule und anschließend das Gymnasium, an dem ich 1967 das Abitur ablegte.

Im Herbst 1967 begann ich an der Freien Universität Berlin das Studium der Biologie. Dort legte ich im Herbst 1969 die Diplomvorprüfung und im Februar 1972 die Diplomprüfung ab.

Die Experimente zu meiner Diplomarbeit entstanden am damaligen Institut für Biophysik der Freien Universität unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Stein.

Seit Juni 1974 bin ich wissenschaftliche Assistentin am Fachbereich IV der Universität Oldenburg.

Am 23. September 1974 schloß ich die Ehe mit Johann Christian Berthe.